

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MUSTAPHA BENBOULAI
-BATNA 2-

Faculte des Sciences de la Nature et de la Vie
Departement de Biologie des
Organismes



Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT TROISIEME CYCLE

Filière

Sciences Biologiques

Option

Biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologies Moléculaires

Présentée par:

YAHIA Massinissa

Thème

**Investigation des Mécanismes Moléculaires
d'induction de la cytotoxicité de l'extrait méthanolique
de la plante : *Hyoscyamus Albus L***

Soutenue publiquement le :/...../.....

Jury :

Président : Mr. SENATOR Abdelrahman

Rapporteur : Mr. YAHIA Mouloud

Co-Directeur : Mr. GRIECO Paolo

Examineur : Mr. AYACHI Ammar

Examinatrice : Mme. HAMBABA Leila

Examineur : Mr. KEBIECHE Mohamed

Grade et Université

Professeur Université Batna-2-

Professeur Université Batna-2-

Professeur Université de Naples Federico II

Professeur Université Batna-1-

Professeur Université Batna-2-

Professeur Université Batna-2-

Année universitaire : 2017-2018

Remerciement

*Je tiens à remercier tout d'abord mon père et mon encadreur **Pr. Yahia Mouloud** qui a toujours été présent pour m'orienter dans mes recherches et qui m'a soutenu du début jusqu'à la fin et également pour m'avoir appris à être moins « un bon élève » et plus autonome tout au long de ce projet de recherche.*

*Je remercie également mon co-encadreur **Pr. Paolo Greico** qui m'a accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire de pharmacologie à l'université de Naples Federico II, ainsi que l'équipe de Recherche dont : **Pr. Michele Caraglia, Amalia Luce, Daniela Rigano, Francesco Merlino, Emanuella berrino, luigi abate, Rosita bellavita, Umberto B, Luigi B, Ezio, Valentina ...**,*

*Un énorme Remercîment Didier au président du jury **Mr. SENATOR Abdelrahman** et également aux membres du jury ; **Mr. Ayachi Ammar, Mm. Hambaba Leila, Mr. Kebieche Mohamed** qui m'ont fait l'honneur de participer à la soutenance ; je les en remercie infiniment.*

Je remercie ma famille < ma mère, mes frères et sœurs > d'avoir procuré toutes les conditions favorables à domicile pour accomplir mon travail

Dédicace

*A la douce memoire de ma grand-mère HAMAMA
Que ton ame angelique repose en paix.
Que la terre te soit légère.*

Citation :

*<Une grande science peut s'allier parfaitement à une grande pauvreté d'esprit. En vérité, j'ai souvent trouvé parmi les esprits incultes un sentiment plus énergique de ce que la vie a de profond que chez certaines espèces de savants.> **Henri-Frédéric Amiel***

Liste des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie théorique

CHAPITRE I GENERALITES SUR LA PLANTE *HYOSCYAMUS ALBUS*

I. La famille des solanacées	1
I.1. Définition.....	1
I.2. Utilisation thérapeutique.....	1
I.3. Description botanique de l'espèce <i>Hyoscyamus albus</i>	2
I.4. Autre nominations de l'espèce <i>Hyoscyamus albus</i>	3
I.5. Taxonomie de la plante	4
I.6. Utilisation en phytothérapie.....	4

CHAPITRE II VOIES D'INDUCTION DE LA CYTOTXICITE ET CANCER

II. 1. Différents types de mort cellulaire et mécanisme de défense	5
II.1.1. Nécrose.....	5
II.1.2. Oncose.....	6
II.1.3. Autophagie	7
II.1.4. L' autoshizie.....	8
II.2. Apoptose	9
II.2.1. Mécanisme de l'apoptose.....	10
II.2.1.1. Voie extrinsèque de l'apoptose	11
II.2.1.2. Voie intrinsèque de l'apoptose.....	12
II.2.2. Voies apoptotiques dans le cancer	12
II.2.2.1. Récepteurs du facteur tumoral de nécrose: Fas et TRAIL	12
II.3. Cancer	14
II.3.1. Croissance et développement du cancer	14
II.3.2. Agents causateurs du cancer	16

I.1.6.2. Purification des molécules par HPLC préparative.....	35
I.1.6.3. Analyse des molécules par HPLC analytique.....	35
I.1.6.4. Analyse par LC-MASS Spectrométrie.....	36
I.1.6.5. Solidification des produits.....	36
I.1.6.6. Résonance magnétique nucléaire (RMN) spectrométrie.....	36
I.1.6.7. Résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle (RMN 2d).....	37
I.2. Etude de l'activité anticancéreuse <i>in vitro</i>	37
I.2.1. Culture cellulaire	37
I.2.2. Test MTT des fractions C, D, F, G.....	37
I.2.3. Marquage de l'apoptose par l'acridine orange	38
I.2.4. Test MTT des molécules FCP1, FCP2 ,FCP3, FFPh, FFP3.....	39
I.2.5. Analyse de l'apoptose par la cytométrie en flux	39
I.3. Etude statistique.....	40
I.4. Structures chimiques.....	40

CHAPITRE II

Résultats et Discussion

II.1. Etude phytochimique de <i>H.albus</i>	41
II.1.1. Extraction et calcul du rendement	41
II.1.2. Analyse qualitative des extraits d' <i>H.albus</i>	41
II.1.3. Séparation sur chromatographie sur colonne et CCM	42
II.1.4. Analyse par HPLC préparative	44
II.1.5. Analyse par HPLC analytique.....	46
II.1.6. Analyse par HPLC spectrométrie de masse.....	47
II.1.7. Analyse par RMN	51
II.2. Evaluation de l'activité anticancéreuse de <i>H.albus (in vivo)</i>	60
II.2.1. Evaluation de l'activité cytotoxique des fractions.....	60
II.2.2. Marquage de l'apoptose par l'acridine orange.....	64
II.2.3. Activité cytotoxique des molécules.....	65
II.2.4. Effet de médicament anticancéreux	74
II.2.5. Evaluation de l'effet apoptotique de Ph FF et P01 FC sur la lignée LN-229... ..	76

Conclusion et perspectives

Bibliographie

Liste des abréviations

¹³C RMN : Résonance magnétique à carbone.

7-AAD : 7-amino-actinomysine

AACC: American Association for Clinical Chemistry

ACN : Acétonitrile

AlCl₃ : Aluminium Chloride

Andro : Andrographolide

ANOVA: Analysis of Variance

AO : Acridine orange

APS : Astragalus polysaccharides

ATG: protéine autophagique relier

BHT :Butylhydroxytoluène

C₃₄H₄₀Cl₄N₆Zn : Acridine

CAPE : Caffeic acid phenethyl ester

CCM : Chromatographie sur couches minces

CH₃OH : Méthanol

CHC : Carcinome hépatocellulaire humain

CHCl₃ : Chloroforme

CI₅₀ : Concentration inhibitrice demi-maximale

DISC :Death inducing signaling complex.

DMEM: Dulbecco's modifications of Eugal's medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: Diphenyl picryl- hydrazyle

DR : Death receptors

DTX : Docétaxel

EBV : Virus d'Epstein Barr

EChl : Extrait chloroformique

EEp : Extrait étheropétrolique

EGFR : Facteur de croissance épidermique

EMe : Extrait méthanolique.

FADD : Fas associated death domain

FBS : Serum bovine foetale
FeCl₃ : chlorure ferrique
FeCl₃:Chlorure de fer
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
GC : Chromatographie en phase gazeuse
GLPS :Ganoderma lucidum polysaccharide
H₂SO₄:Acide sulfurique
HAMeOH: Extrait méthanolique d'*Hyoscyamus albus*
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycyclique
HCE : Endothélium cornéen humain
HCE : Human cornealendothelium
HCl :Acidechlorydrique
HHV-6 : Herpès humain Virus 6
HHV-6 : Herpes human virus-6
HHV-8 : Virus de l'herpès humain 8
HPLC:High-performance liquid chromatography
HPV : Papillomavirus humain
HSV : Anti-Herpes simplex virus
HTLV-1 : Virus de la leucémie de type 1
IC : Indice de combinaison
LAM : Leucémie aiguë myéloblastique
LC-MASS :Chromatography-mass spectrometry
LDH: Lactate deshydrogénase
MCPyV : Merkel Polyomavirus
MMP : la matrice metalloproteinase
MPT : Transition de perméabilité mitochondriale
MTT : (4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide
NK : Natural killer
OSCC : Carcinome épidermoïde oral
NNK : Nitrosamine cétone dérivée de la nicotine
PA : Polyamines
PARP : poly (ADP-ribose) polymérase
PBS: Phosphate-buffered saline
PI : Iodure de propidium
PLA-TPGS : Poly (lactide) -D-α-tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate

PS : phosphatidylsérine

RAB : protéine Ras reliair

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Espèces réactifs oxygénées.

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

RTKI : Récepteurs tyrosine kinase inhibiteurs

SD: Standard Deviation

SL : Sesquiterpènes lactones

SMAC : Second mitochondrial-derived activator of caspases

Spd : spermidine

Spm : Spermine

TCS : Trichosanthine

TNF-R : Tumor necrosis factor receptor

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale

TP53 : protéine tumorale (un facteur de transcription)

TPQ : tetrahydropyrrolo quinolin

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

UICPA : l'Union internationale de chimie pure et appliquée

UV : ultraviolets

VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

β -HCH : β -Hexachlorocyclohexane

β -HCH : β -hexachlorocyclohexane

Liste des figures

<u>Figure 1.</u> <i>Hyoscyamus albus</i> avec ses parties principales	3
<u>Figure 2.</u> Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par nécrose	6
<u>Figure 3.</u> Comparaison d'aspect morphologique de l'apoptose	7
<u>Figure 4.</u> Modèle hypothétique de macroautophagie	8
<u>Figure 5.</u> Mécanisme moléculaire de l'apoptose et de la mort cellulaire autophagique.....	10
<u>Figure 6.</u> la cascade d'activation de la voie extrinsèque apoptotique	11
<u>Figure 7.</u> Schéma simplifié des voies apoptotiques	14
<u>Figure 8.</u> Clonalité de la tumeur	15
<u>Figure 09.</u> Etapes de développement de la tumeur.....	18
<u>Figure 10.</u> Berberine, evodiamine, matrine, piperine, sanguinarine et la tétrandrine	21
<u>Figure 11.</u> Structures chimiques de la camptothécine (a), de la matrine (b), du paclitaxel (c) et du docétaxel (d).....	23
<u>Figure 12.</u> Schéma de la machinerie moléculaire et des cibles possibles pour les propriétés antinéoplasiques de certains alcaloïdes ainsi que la berbérine, de l'évodiamine, de la matrine, de la pipérine, de la sanguinarine et de la tétrandrine.	24
<u>Figure 13.</u> Différents trajets et les voies moléculaires régulés par les flavonoïdes.....	26
<u>Figure 14.</u> Structures chimiques de la podophyllotoxine (e), de la licochalcone A (f), de la baicaline (g) et des isoflavones (h).	26
<u>Figure 15.</u> Structures chimiques du ginsenoside Rg3 (i), Rh2 (j) et polysaccharide (k).....	29
<u>Figure 16.</u> Schéma d'extraction par les solvants organiques de <i>H.albus</i>	32
<u>Figure 17.</u> Chromatogramme des phases aqueuses et butanoliques de <i>H.albus</i>	43
<u>Figure 18.</u> Chromatogramme de fractions obtenus de la phase butanolique de <i>H.albus</i> après purification sur la colonne de séphadex	44
<u>Figure 19.</u> Chromatogramme de l'HPLC préparative de la fraction F.....	45
<u>Figure 20.</u> Chromatogramme de l'HPLC préparative de la fraction C.....	45
<u>Figure 21.</u> HPLC analytique et pic H fraction F	46
<u>Figure 22.</u> HPLC analytique du pic 1 fraction C.....	46
<u>Figure 23.</u> HPLC analytique du pic 2 fraction C.....	47
<u>Figure 24.</u> HPLC analytique du pic 3 fraction C.....	47
<u>Figure 25.</u> Spectre de Lc-mass Fraction F pic H.....	48
<u>Figure 26.</u> Spectre de Lc-mass Fraction F pic 3.....	49
<u>Figure 27.</u> Spectre de Lc-mass Fraction C pic 1	49
<u>Figure 28.</u> Spectre de Lc-mass Fraction C pic 2	50
<u>Figure 29.</u> Spectre de Lc-mass Fraction C pic 3	50
<u>Figure 30.</u> Spectre RMN ^1H de pic H fraction F.	51

<u>Figure 31.</u> Structure chimique de la molécule Ph-FF Quercetin-3 -D-glucopyranosyl-(1 6)-B-D-glucopyranoside (QCGG)..	52
<u>Figure 32.</u> Spectre RMN H ¹ du Pique 3 fraction F.	53
<u>Figure 33.</u> Spectre RMN C ¹³ du pique 3 fraction F.	54
<u>Figure 34.</u> Structure chimique de la N-trans-Feruloyltyramine (FF-P3).	54
<u>Figure 35.</u> Spectre RMN H ¹ du pique 1 fraction C.	56
<u>Figure 36.</u> Structure Chimique de la N ¹ -(hydro)caffeoyle-N ⁸ -(hydro) caffeoyle spermidine.	56
<u>Figure 37.</u> Spectre RMN H ¹ du Pique 2 fraction C.	57
<u>Figure 38.</u> Structure chimique de l'atropine (C ₁₇ H ₂₃ NO ₃).	58
<u>Figure 39.</u> Graphes a ,b ,c et d montrant l'effet cytotoxique des fractions C,D,F et G sur les lignées DU-145 , PC-3,LNCaP,U-87MG et U-373 MG respectivement après 72 h de traitement	62
<u>Figure 40.</u> Visualisation de l'aspect morphologique de l'apoptose marqué par l'AO. Comparaison entre les cellules témoins traitées par la fraction C sur la lignées PC-3 (a,b) et cellules DU-145 (c,d).	64
<u>Figure 41.</u> Graphes (a,b ,c,d,e et f) montrent les effets cytotoxiques des produits purifiés de la fraction C de <i>H.albus</i> sur DU-145, PC-3, LN-229 et U-373 MG, respectivement	70
<u>Figure 42.</u> Graphes (a,b et c) montrent les effets cytotoxiques de Docetaxel sur DU-145, LN-229 et U-2 OS respectivement, pour des traitements de 72 h	75
<u>Figure 43.</u> Détection de l'apoptose par cytométrie en flux par coloration à l'annexine V-PI de cellules LN-229 traitées avec les produits de <i>H.albus</i> .	78
<u>Figure 44.</u> Effet apoptotique des produits de <i>H.albus</i> sur la lignée cellulaires LN-229.	79

Liste des tableaux

<u>Tableau 1.</u>	Rendement des différents extraits (EEP, EChl , EMe) des feuilles de <i>H.albus</i>	41
<u>Tableau 2.</u>	Tests chimiques des extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles de <i>H.albus</i>	42
<u>Tableau 3.</u>	Poids des extraits et des phases aqueuses et butanoliques de <i>H.albus</i>	42
<u>Tableau 4.</u>	Fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique de <i>H.albus</i> .	43
<u>Tableau 5.</u>	Le poids moléculaire des molécules obtenues est classé.	48
<u>Tableau 6.</u>	Effet cytotoxique des fractions C, D, F, G de HAMEOH sur les cinq lignées cellulaires cancéreuses.	61
<u>Tableau 7.</u>	Valeurs IC50 des produits de la fraction C et la fraction F de <i>H.albus</i> sur les lignées cellulaires DU-145, PC-3, LN-229 et U-373 MG pour les traitements de 72 h.	67
<u>Tableau 8.</u>	Valeurs IC50 de Docetaxel sur les lignées cellulaires DU-145, LN-229 et U-2 pour les traitements de 72 h.	74
<u>Tableau 9.</u>	Pourcentage de populations cellulaires de LN-229à différents stades (vivants, apoptotiques et nécrotiques) suivant le traitement des produits Ph FF et P01 FC après évaluation par double coloration (V-FITC / PI)en utilisant un test de cytométrie en flux	78

Introduction

Introduction

Le cancer est l'une des principales causes majeures de mortalité dans le monde, il est défini comme une maladie dans laquelle un groupe de cellules anormales croissent de façon incontrôlable car elles ont la capacité de développer un certain degré d'autonomie par rapport à des signaux de différenciation ou de mort, ce qui entraîne une croissance et une prolifération incontrôlée, selon l'OMS le nombre de morts est estimé 12 millions en 2030. En Algérie, plus de 40 mille cas de cancer sont enregistrés chaque année [Hamdi cherif *et al* 2015].

Le traitement de cette maladie est encroissance lente à cause du coût élevé des thérapies anticancéreuses, les effets indésirables des médicaments utilisés et leur mécanisme d'action abstrus et peu sélectif, justifient l'orientation à la médecine traditionnelle qui est parfois la seule source de soins disponible et accessible par la plupart des patients et surtout ceux d'Afrique et de l'Asie .

Les plantes représentent une source inexhaustible et inépuisable de principes actifs, dont l'utilisation traditionnelle et médicale est connue depuis des siècles, donc la production de nouvelles molécules bioactives purifiées et concentrées est une nécessité pour la lutte contre cette maladie et son investissement dans une large voie d'application (suppléments alimentaires , cosmétiques, pharmaceutiques, parapharmaceutiques, additifs nutritionnels...etc.). Malgré le grand nombre des laboratoires dans le monde qui ont convertis leurs axes de recherches vers l'investigation dans la recherche de nouvelles molécules naturelles, le cancer reste toujours un cauchemard dans le monde [Zhang *et al.*, 2013].

Les principes actifs qui composent les plantes médicinales sont attribués principalement à leurs métabolites secondaires, leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnu et répertorié, et donc mises à profit, dans le cadre de la médecine traditionnelle et également dans la médecine allopathique moderne.

Sur le plan chimiotaxonomique, la plante *Hyoscyamus albus* appartient à la famille des Solanacées reconnue par sa richesse en métabolites secondaires et particulièrement en alcaloïdes tropaniques. En médecine traditionnelle, cette espèce est utilisée comme un parasympatholytique et comme un sédatif nerveux [Mahmood *et al.*, 2001].

Dans ce contexte, nous sommes intéressés dans un premier temps à l'isolment et à la purification des molécules bioactives de l'extrait méthanolique de la plante médicinale *Hyocyamus albus* et d'étudier leur activité biologique anti-tumoral puis leur mecanismes inducteurs de la mort cellulaire dans un deuxième temps.

Ce manuscrit comporte deux parties :

- La première est d'ordre théorique à travers laquelle une description de la plante *Hyoscyamus albus*, des connaissances sur l'apoptose et cancer et la biothérapie de ce dernier ont été abordés.

-La deuxième partie, est une étude expérimentale qui repose sur deux volets, le premier concerne une étude phytochimique basée principalement sur l'extraction et la détermination qualitative et quantitative des produits actifs dans l'extrait méthanolique de *H.albus*; le fractionnement et la purification par chromatographie sur colonne LH-20, HPLC analytique et préparative et une identification par RMN à proton, à carbon 13 et RMN bidimensionnelle et spectrophotométrie de masse LC.

Le second volet a été consacré à l'évaluation de l'activité cytotoxique des différentes fractions obtenues ainsi que les molécules purifiées *in vitro* par le test MTT et l'étude du mécanisme d'action de la cytotoxicité des produits actifs. Les résultats obtenus sont exprimés et discutés.

Partie théorique

Chapitre I

GENERALITES SUR LA PLANTE HYOSCYAMUS ALBUS

Hyoscyamus albus L. est une plante qui appartient à la famille des Solanacées composé de 23 espèces réparties en Europe occidentale, West Sud d'Asie, Chine et en Afrique du Nord autour du bassin méditerranéen dans les régions montagneuses [Ratsch, 2005], rencontré sur les talus, les falaises et les plages de galets, les décombres, murs et des rochers [Jouzier, 2000 ; Goullé et al., 2004].

D'après Lee et al., (2006), la richesse des extraits de *H.albus* par les alcaloïdes, développe son utilisation en médecine traditionnelle depuis des années jusqu'aujourd'hui.

Toutes les espèces de *Hyoscyamus* sont des sources riches en alcaloïdes et de tropane, principalement l'hyoscyamine et la scopolamine, qui sont utilisées pour leurs propriétés mydriatiques, antispasmodiques, anticholinergiques, analgésiques et nerveux sédatives [Bourebaba et al., 2016].

Hyoscyamus albus a été utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreux pays essentiellement comme sédatif du SNC, anti-névralgique, dans la maladie de Parkinson pour ses propriétés antispasmodiques et un analgésique et aussi comme remède anti-inflammatoire, antihelminthique, antipyrétique et antitumoral [Begum et al., 2010].

I.1. Famille des solanacées

I.1.1. Définition

Les solanacées est une grande famille qui appartient au groupe végétal des tubiflores. Elle inclut 6 sous familles et près de 95 genres et environ 2300 espèces dont la plupart sont toxiques et contiennent de nombreuses drogues importantes. ils ont plusieurs caractères en commun et se distinguent facilement des autres membre par la forme des fleurs composées de cinq pétales et le même nombre d'étamines racordés près au dessus de corole.[Zhi-yun et al., 1994 ;Goullé et al.,2004].

I.1.2. Utilisation thérapeutique

En thérapie, la famille des solanacées sont les anticholinergiques les plus puissants, ce qui signifie qu'ils inhibent les signaux neurologiques transmis par les neurotransmetteurs endogènes comme l'acétylcholine. Les espèces importantes de la famille des Solanacées sur le plan médical appartiennent aux genres suivants : Solanum, Atropa, Capsicum, Datura, Withania, Hyoscymus, Nicotiana et Divers. Ces espèces sont largement utilisées à des fins médicinales. La famille des solanacées est typiquement ethnobotanique, c'est-à-dire largement utilisée par les humains. Elle présente une source importante de nourriture, d'épices et de médicaments. Cependant, les espèces de solanacées sont riches en alcaloïdes dont la toxicité pour les humains et les animaux varie, est légèrement irritante et mortelle en grande quantité [Vishal Vilas S et al., 2013].

I.2. Description botanique de l'espèce *Hyoscyamus albus*

L'espèce *Hyoscyamus albus* est une plante annuelle ou bisannuelle reconnue par des petites feuilles (5 à 10 cm de long) larges, ovales, collantes et de couleur verte clair et par ces tiges dressées qui peuvent atteindre jusqu'à 90 cm de hauteur, sa période de floraison s'étale du mois de mai au mois d'Août (**Figure 1**) [Mahmood *et al.*, 2001].

Hyoscyamus albus L dérive de la méthyologie grec qui signifie Hyos (le cochon) et Kiamos (haricot), le nom de l'espèce (*albus*) blanc parce que les cochons peuvent manger cette plante sans aucun dommage; le nom spécifique se réfère aux fleurs de couleur plus claire que ceux de *Hyoscyamus niger* (noir)[Lee, 2006].

Quelques noms non scientifiques de *H.albus* sont : en Arabe : sakaran , en dialecte Chaoui Amazighe : Guinguith, en Français : Jusquiame, en Anglais :White Henbane , en Italien : Gisquiamobianco.

Hyosyamus albus est aussi caractérisée par son odeur fétide, la saveur de ses feuilles est herbacée, très peu acre. Cette odeur nausée abondante caractéristique du genre *Hyoscyamus* est causée par ces composés tetrahydroputrescines qui font rappel à ceux des cadavres et qui est peut être une raison pour attirer les insectes porteurs de pollins [Lee, 2006].

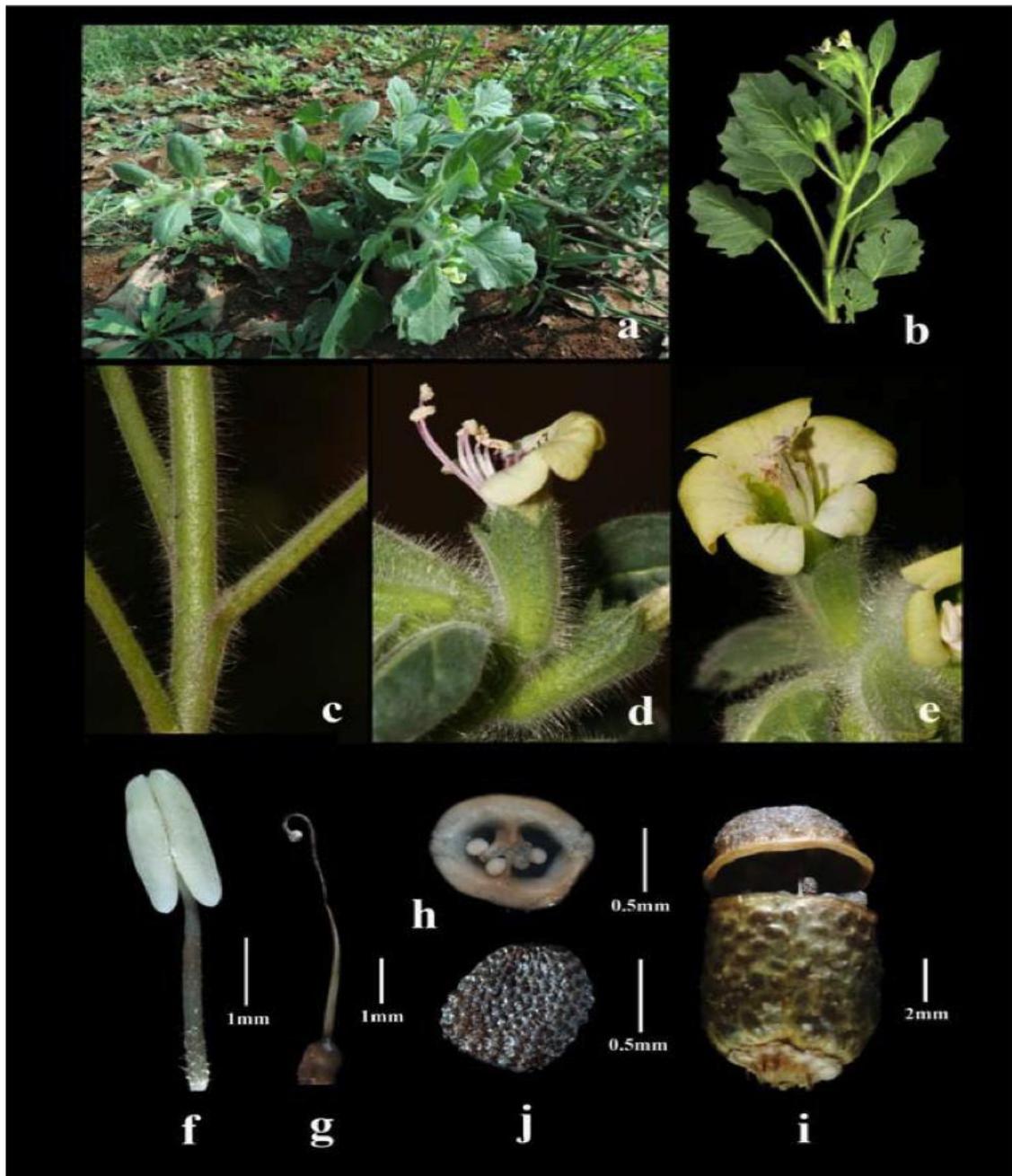


Figure 01. *Hyoscyamus albus L* et ces parties principaux : **a.** Habitat; **b.** branche; **c.** tige; **d-e.** différentes couleurs; **f.** étamine; **g.** Gynoecium; **h.** ovaires.; **i.** Fruit; **j.** graine. [Swamy et Annamma, 2015].

I.3. Autres nominations de l'espèce *H.albus*

- *Hyoscyamus Varians*
- *Hyoscyamus Clusii* G. Don
- *Hyoscyamus Luridus* Salisb.
- *Hyoscyamus major* Mill.
- *Hyoscyamus minor* Mill.
- *Hyoscyamus Ccanariensis* Ker Gawl.
- *Hyoscyamus Saguntinus* Pau [Quézel et Santa, 1963].

I.4. Taxonomie de *H.albus*. [Treas et Evans, 1983]

Règne : Végétal

Sous règne : Eucaryotes

Embranchement : phanérogamae

Sous embranchement : Angiospermae

Classe : Dicotylédones

Série : sympétales

Ordre : tubiflores

Famille : solanaceae

Genre : *Hyoscyamus*

Espèce : *Hyoscyamusalbus*

I.5. Utilisation de la plante *H. albus* en phytothérapie

Hyocamus albus L n'est pas une plante célèbre dans le monde pour utilisation en voix médicinal mais dans l'autre part, elle est utilisée dans la région nord africaines pour traiter un grand nombre de maladies comme ; la démence chronique, tractus gastro-intestinal et l'ulcère gastrique ou duodénal, la toux spasmodique, asthme et même comme un antidiabétique [Batanouny, 1999 ; Bourebaba *et al.*,2016].

CHAPITRE II

VOIES D'INDUCTION DE LA

CYTOTOXICITE

ET CANCER

Les mécanismes physiologiques de la mort cellulaire sont généralement utilisés par les organismes multicellulaires dans les phénomènes biologiques de développement et aussi de la morphogenèse pour contrôler les divisions cellulaires ainsi comme une stratégie de défense pour éliminer les cellules endommagées, infectées, mutées et les cellules pathologiques [David *et al.*, 1991].

Auparavant, la mort cellulaire était généralement classée en deux types seulement : l'apoptose et la nécrose. Cependant, il est devenu de plus en plus évident qu'une telle catégorisation est simple. En effet, 12 formes de mort cellulaire ont été décrites dans la littérature. Elles sont regroupées en cinq types principaux : apoptose, nécrose, autophagie, paraptose et autoschizie [Horvitz *et al.*, 2003].

En raison de chevauchement entre les voies de signalisation de ces types de mort cellulaire, il est difficile de fournir des définitions exclusives pour chacun. Cependant, ils ont approuvé que l'inhibition d'une forme de mort cellulaire peut conduire à un autre. Bien que le terme "mort cellulaire programmée" été utilisé spécifiquement pour décrire l'apoptose, d'autres formes de mort cellulaire peuvent également tomber dans cette catégorie, si l'activation du gène est requise pour leur exécution [Horvitz *et al.*, 2003].

I.1.Types de mort cellulaire et mécanisme de défense

II.1.1. Nécrose

La nécrose résulte d'une variété de lésions accidentelles et mortelles qui est actionner par des toxines ou des stimuli physiques ou en association avec des conditions pathologiques, telles que l'ischémie. Elle est caractérisée par un œdème cellulaire, la dissolution de la chromatine nucléaire, la rupture de la membrane plasmique, et la libération de contenu intracellulaire dans l'espace extracellulaire, ce qui entraîne une inflammation.

En revanche, des dommages à la membrane se produisent très tard dans l'apoptose, où les cellules mortes sont englouties par les cellules voisines ou phagocytes, bien que la nécrose est principalement considérée comme une forme accidentelle de mort cellulaire, des données plus récentes ont suggéré que la nécrose peut également se produire comme une forme programmée de mort cellulaire. Leist *et al.*, (2001) ont montré que les formes de la mort cellulaire nécrotiques et apoptotiques peuvent partager quelques similitudes. Néanmoins, la nécrose a été observée dans des cellules ayant une machinerie apoptotique défectueuse ou lors de l'inhibition de l'apoptose [Nicotera *et al.*, 1998]. D'après Zong *et al.*, (2004), cette forme de

mort cellulaire est en train de devenir un outil thérapeutique important pour le traitement du cancer.

Certaines formes de mort cellulaire peuvent avoir un mélange de caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose et sont appelées «apoptose» (Figure 02), [Formigli *et al.*, 2000].

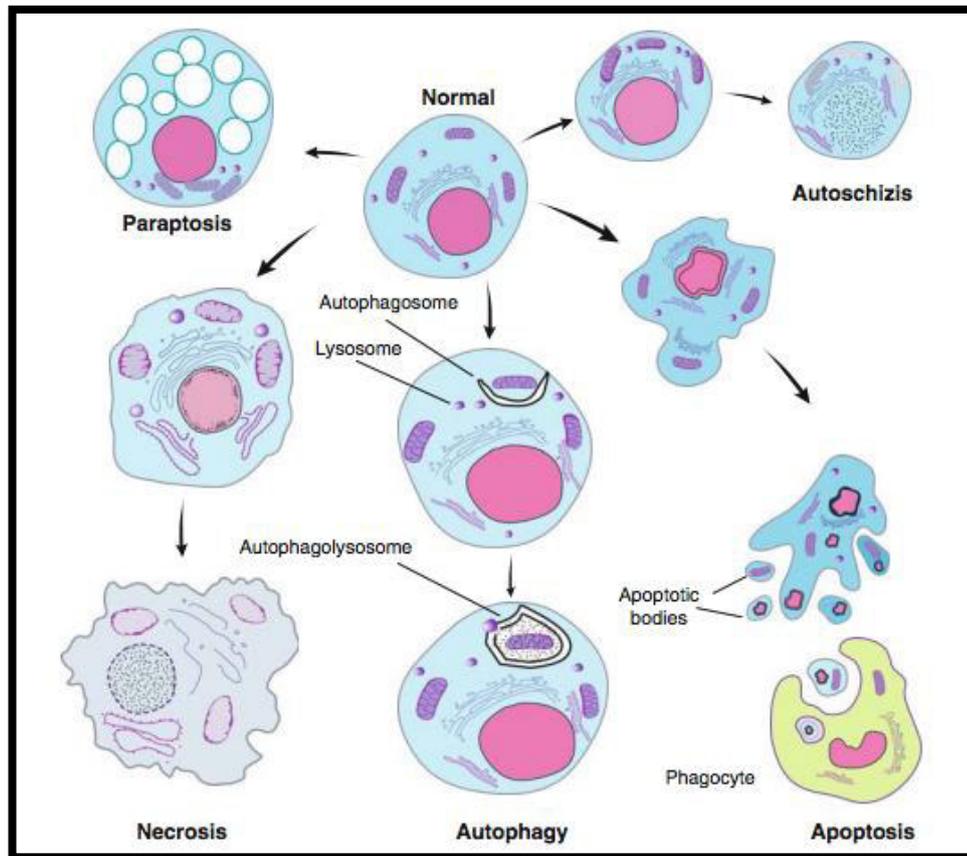


Figure 02. Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par : Nécrose (**necrosis**): les cellules meurent par nécrose, et leurs organelles sont typiquement enflées. **Apoptose (apoptosis)**: les cellules meurent par mort cellulaire programmée de type I (également appelé apoptose); ils sont rétrécis et développent des bulles contenant cytoplasme dense.. La chromatine nucléaire subit une condensation saisissante et fragmentation. Terminellement, cellules apoptotiques et des fragments sont engloutis par les phagocytes ou environnants cellules. **Autophagie (autophagy)**: les cellules meurent par cellule programmée de type II. Une caractéristique qui distingue l'apoptose de la mort cellulaire autophagique est la source des enzymes lysosomales utilisées pour la plupart de la cellule mourante. Autoschizis : la membrane cellulaire forme des coupures ou des schismes qui permettent le cytoplasme à fuir. La cellule se réduit à environ un tiers de sa taille originale, et le noyau et les organites restent entourés par un minuscule ruban de cytoplasme [Saikumaret *al.*, 2009].

II.1.2. Oncose

L'oncose est caractérisée par des caractéristiques proches à la nécrose. Elle se caractérise par un gonflement de la cellule et de quelques organites comme le noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique, causé par l'inactivation des pompes ioniques au

niveau de la membrane plasmique, et une vacuolisation du cytoplasme [Majno et Joris, 1995]. Aussi l'intégrité de la membrane plasmique est préservée au cours de l'oncose (figure 03) [Weerasinghe et Buja, 2012].

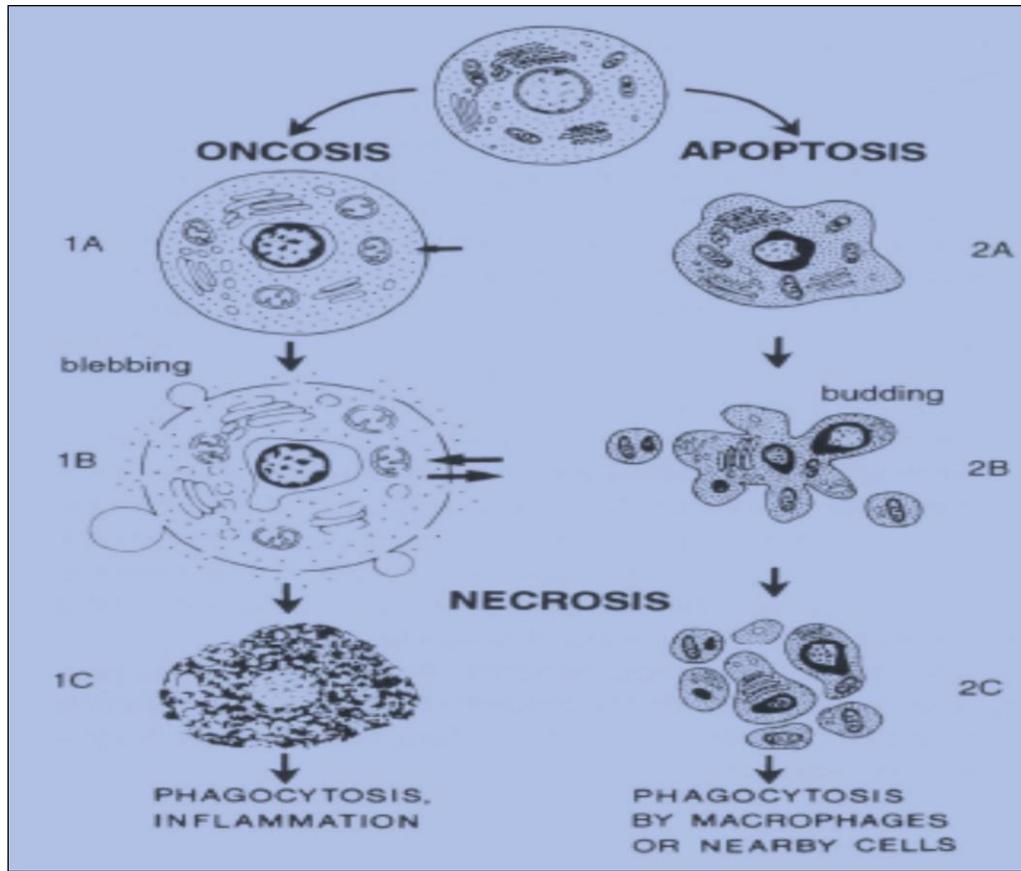


Figure 03. Comparaison d'aspect morphologique de l'apoptose [Majno et Joris, 1995].

II.1.3. Autophagie

L'autophagie est un processus catabolique qui digère le contenu cellulaire dans les lysosomes, c'est une fonction constitutive de bas niveau qui est accélérée par une variété de facteurs de stress cellulaires tels que la privation des nutriments, les dommages de l'ADN et les dommages des organites [Kroemer *et al.*, 2010]. L'autophagie est mécanisme protecteur qui facilite la dégradation des constituants cellulaires superflus ou endommagés, bien que l'hyperactivation de l'autophagie puisse conduire à la mort cellulaire [Klionsky, 2007].

Dans ce processus multi étapes, le cytoplasme et les organites endommagés sont séquestrés à l'intérieur des membranes qui finissent par mûrir en structures à double membrane appelées autophagosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former des autolysosomes qui digèrent les composants séquestrés. La base moléculaire de l'autophagie a

d'abord été étudiée chez des levures mutantes déficientes en autophagie (figure 04) [Nakatogawa *et al.*, 2009].

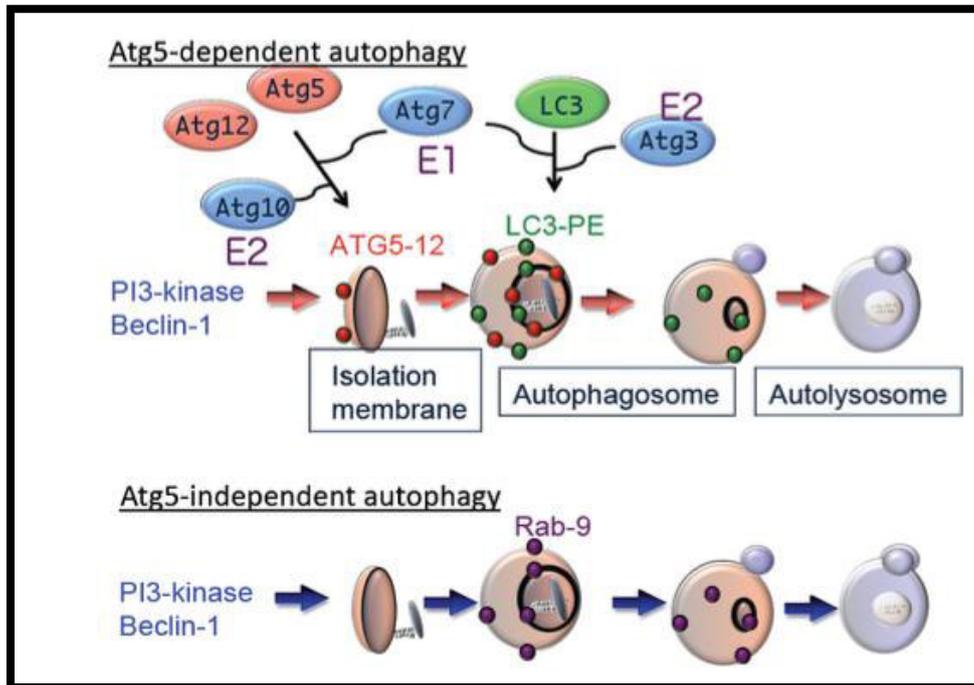


Figure 04. Modèle hypothétique de macroautophagie : Il existe au moins deux modes de macroautophagie, la macroautophagie conventionnelle et alternative. La macroautophagie conventionnelle dépend de la protéine Atg5 et de l'Atg7, est associée à la modification de la chaîne légère 3 (LC3) et peut provenir de la membrane de contact du réticulum endoplasmique (ER) - mitochondrial. En revanche, la macroautophagie alternative se produit indépendamment de l'expression Atg5 ou Atg7 et de la modification LC3. La génération de vacuoles autophagiques dans ce type de macroautophagie peut provenir de la membrane de Golgi et des endosomes tardifs (LE) d'une manière dépendante de Rab9. Bien que ces deux processus conduisent à une dégradation en masse des protéines ou organites endommagés en générant des autolysosomes [Shimizu *et al.*, 2018].

II.1.4. Autoschizie

Une nouvelle forme de mort cellulaire, qui s'est avérée être déclenché par le stress oxydatif, elle se diffère de l'apoptose et de la nécrose et se caractérise par une réduction du cytoplasme, une bordure étroite autour du noyau avec marginalisation de la chromatine et le noyau entier de l'intérieur [Gilloteaux *et al.*, 2001]. La mitochondrie et d'autres organites se regroupent autour du noyau en conséquence de lésions du cytosquelette et la perte de cytoplasme. Intéressamment, le réticulum endoplasmique rugueux est conservé jusqu'à la fin du stade de l'autoschizie, dans lequel les cellules se fragmentent et le nucléole devient condensé et se brise en plus petits fragments [Jamison *et al.*, 2002].

L'enveloppe nucléaire se dissipe finalement avec le reste des organites après la mort cellulaire. Dans ce type de mort, les cellules perd le cytoplasme par auto-morsellation ou auto-

excision. L'Autoschizie affecte généralement les groupes contigus de cellules à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais peut également affecter de temps en temps les cellules individuelles dispersées piégées dans les sinus sous-capsulaires du nœud lymphatique [Gilloteaux *et al.*, 2004].

II.1.5. Apoptose

L'apoptose est la forme la plus cruciale de mort cellulaire chez les mammifères, dont sa voie de signalisation moléculaire est bien définie selon plusieurs études [Tsujiimoto *et al.*, 2003].

Les cellules des mammifères possèdent deux voies de signalisation apoptotiques, connues sous le nom de voies intrinsèques et extrinsèques, dans la voie intrinsèque, la plupart des stimulus apoptotiques transmettent des signaux de mort aux mitochondries et augmentent la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, ce qui conduit à la libération de protéines apoptogènes, comme le cytochrome c, la protéine mitochondriale (Smac) et Omi, dans le cytoplasme des mitochondries.

Après sa libération, le cytochrome c s'associe au facteur 1 d'activation de la protéase apoptotique (Apaf-1), qui active la cascade des caspases pour exécuter la mort cellulaire apoptotique. Smac et Omi accélèrent l'activation des caspases en inhibant les membres de la famille d'Inhibition d'apoptose (IAP) qui agissent comme des inhibiteurs endogènes des caspases.

La perméabilité de la membrane mitochondriale associée à l'apoptose est principalement contrôlée par les membres de la famille Bcl-2, qui comprennent trois sous-groupes : les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1); protéines pro-apoptotiques multi-domaines (Bak et Bax); et des protéines avec seulement le domaine BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Noxa et Puma), parmi eux, Bak et Bax jouent un rôle essentiel dans la libération des protéines apoptogènes [Wei *et al.*, 2001].

Dans la voie extrinsèque, l'engagement des récepteurs de mort, tels que Fas et le facteur de nécrose tumorale- α , activent directement la caspase-8 qui active les caspases en aval, comme la caspase-3 ou la caspase-7, qui induisent la mort cellulaire par l'apoptose [Lindsten *et al.*, 2000].

II.1.5. 1. Mécanismes de l'apoptose

Les mécanismes de l'apoptose sont très complexes et impliquent une cascade d'événements moléculaires qui nécessitent de l'énergie. Des recherches antérieures indiquent

qu'il existe deux voies principales de l'apoptose : une voie extrinsèque ou celle du récepteur de la mort et l'intrinsèque ou la voie mitochondriale. Une autre voie intervient également au cours de la cytotoxicité induite par les lymphocytes T qui implique une perforine-granzyme médiée par la mort cellulaire [Martinvalet *et al.*, 2005].

Les voies convergent ensuite sur la même voie d'exécution terminale, initiée par le clivage et activation des caspases-3 et -7 effectrices, entraînant la dégradation des protéines cytoplasmiques, cytosquelettiques et nucléaires, fragmentation de l'ADN nucléaire, formation de corps apoptotiques, expression de ligands à la surface cellulaire pour la phagocytose et finalement l'absorption par les cellules phagocytaires (figure 05) [Schneider D *et al.*, 2004].

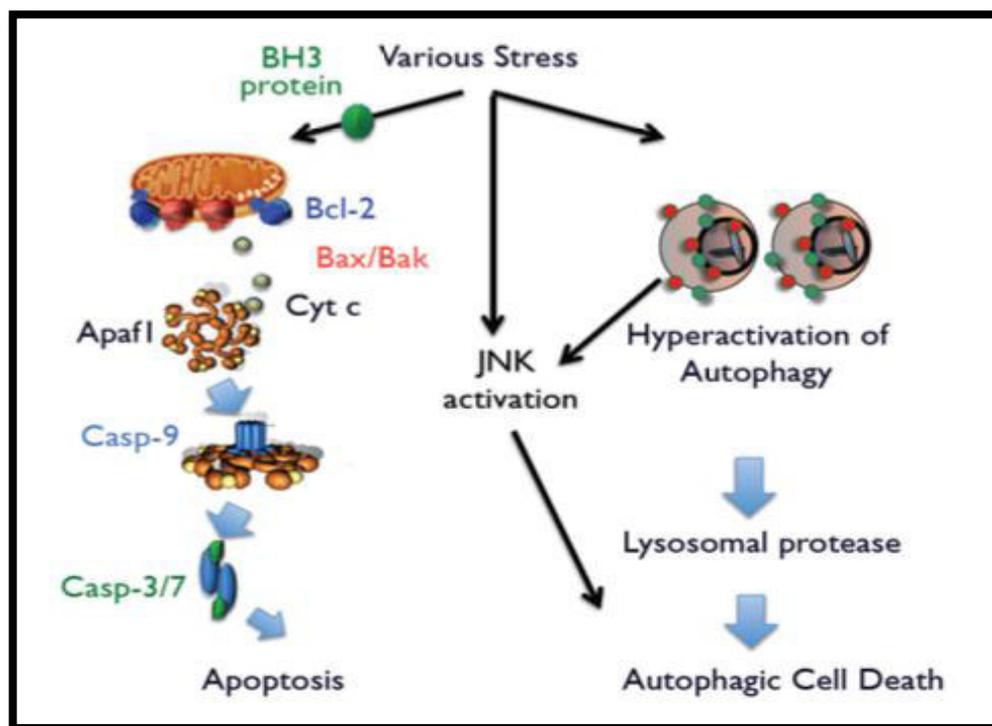


Figure 05. Mécanisme moléculaire de l'apoptose et de la mort cellulaire autophagique. Une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe est cruciale pour l'apoptose et régulée par des membres pro-apoptotiques multidomains de la famille Bcl-2 (Bax et Bak), entraînant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Ensuite, le cytochrome c s'associe au facteur 1 d'activation de la protéase apoptotique (Apaf-1), qui active la cascade des caspases pour exécuter la mort cellulaire apoptotique. La perméabilité de la membrane mitochondriale associée à l'apoptose est principalement contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Lorsque l'apoptose est bloquée, divers stimuli apoptotiques activent l'autophagie et la kinase C-Jun N-terminale (JNK), entraînant l'induction de la mort cellulaire autophagique [Shigeomi *et al.*, 2015].

✓ Voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque implique la liaison des ligands de la mort comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), le ligand CD95 (Fas ligand), et le ligand qui induit l'apoptose lié au TNF (TRAIL) à leurs récepteurs de la surface cellulaire apparentés à TNFR1, CD95 / Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, et la série de récepteurs DR, 50 qui entraînent l'activation de la caspase-8 (également connu en tant que protéase de type ICE / CED-3 homologue FADD, ou FLICE) et l'activation subséquente de la caspase-3 effectrice [Ashkenazi *et al.*, 1998].

Les domaines cytoplasmiques des récepteurs de la mort contiennent le "domaine de la mort", qui joue un rôle crucial dans la transmission du signal de la surface de la cellule à la signalisation intracellulaire des molécules [Scaffidi, 1999 ; Wajant, 2002].

La Liaison des ligands à leurs récepteurs apparentés entraîne la trimérisation du récepteur et le recrutement de l'adaptateur des protéines à la membrane cellulaire, ce qui implique des interactions homophiles entre les domaines de la mort des récepteurs et les protéines adaptatrices. La protéine adaptatrice pour les récepteurs TNFR1 et DR3 sont des protéines du domaine de mort associées au TNFR (Figure 06)[Hsu *et al.*, 1995].

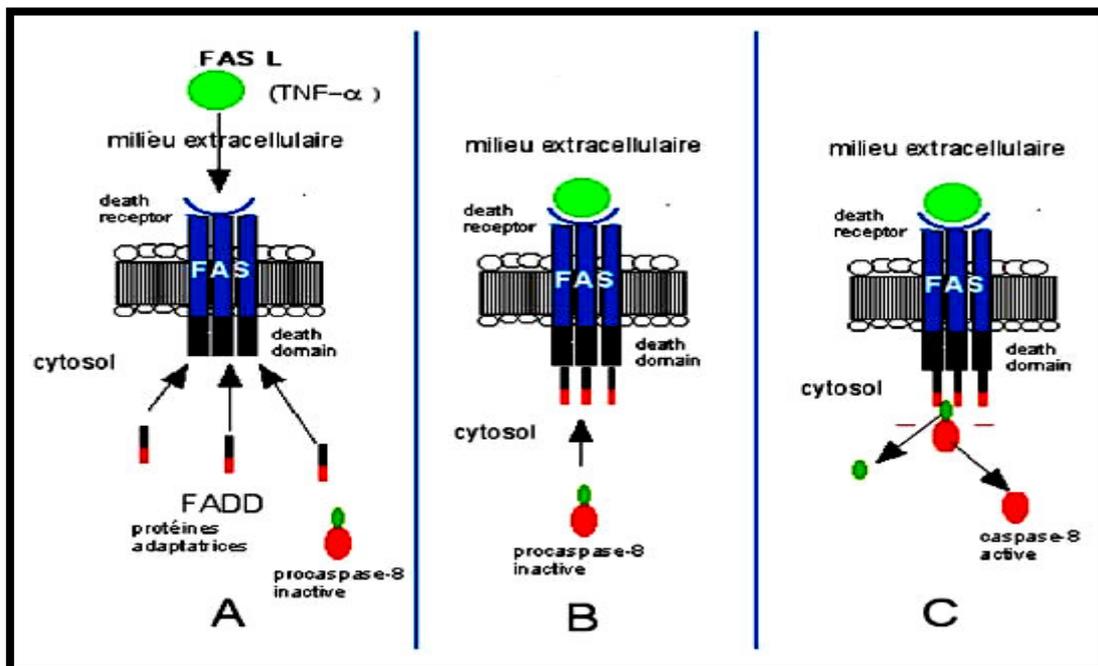


Figure 06. Cascade d'activation de la voie extrinsèque apoptotique. A- formation du complexe FASL/FAS, B- trimérisation et formation du FADD, C- activation et libération de la procaspase-8 dans le cytosol [Hsuet *et al.*, 2004].

✓ Voie intrinsèque de l'apoptose (voie mitochondriale)

Les cellules peuvent répondre à divers stimuli stressants et métaboliques de perturbations en déclenchant l'apoptose. Les Drogues, toxines, chaleur, la radiothérapie, l'hypoxie et les infections virales sont quelques-uns des stimuli connus pour l'activation des voies de l'apoptose. Cependant la mort cellulaire, n'est pas nécessairement inévitable après l'exposition à ces agents, et ces mécanismes déterminant l'issue de la blessure sont un sujet d'intérêt.

Le consensus actuel semble d'être qu'il est l'intensité et la durée du stimulus qui déterminent le résultat. Le stimulus doit aller au-delà d'un seuil pour conduire les cellules à l'apoptose. Bien que le mécanisme exact utilisé par chaque stimulus peut être unique et différent, quelques grands modèles peuvent être identifiés. Par exemple, les agents qui endommagent l'ADN, tel que les rayonnements ionisants et certains xénobiotiques, à l'activation de mécanismes véhiculés par la p53 qui conduisent les cellules à l'apoptose, au moins d'une partie grâce à la régulation transcriptionnelle des protéines pro-apoptotiques [Newmeyer *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2002].

D'autres contraintes induisent une augmentation de l'activité des protéines kinases activées par le stress, ce qui entraîne finalement l'engagement apoptotique [Kunz *et al.*, 2001]. Ces différents mécanismes convergent dans l'activation des caspases [Chinnaiyan, 1999 ; Hill *et al.*, 2004].

II.1.5. 2. Voies apoptotiques dans le cancer**✓ Récepteurs du facteur tumoral de la nécrose : Fas et TRAIL**

La famille des récepteurs de la mort (DR) qui inclut les récepteurs du facteur de la nécrose tumorale TNF-R1, Fas, DR3, TRAIL-R1 / 2 (DR4 / 5) et DR6 peuvent initier la voie extrinsèque menant à l'apoptose [Sayers, 2011]. La similarité entre les membres de cette famille repose principalement sur des récepteurs dans des régions cytoplasmiques, connus par les domaines de la mort (DD), lorsqu'ils sont liés à leurs ligands appropriés, ils recrutent la Fas associé au domaine de la mort (FADD).

Lorsque la pro-caspase-8 devient hydrolysée en caspase-8 active, la protéine adaptatrice recrutée contient le domaine de mort effecteur (DED), Lorsque les stimuli se produisent comme Fas combine avec Fas-L, le complexe de la mort recrute la FADD et de pro-caspase-8, la formation du DISC est initiée pour activer la caspase-8 [Sun, 2011].

✓ La famille Bcl-2

La famille Bcl-2 comprend des régulateurs clés de l'apoptose qui peuvent être soit des protéines pro-apoptotiques entre autres Bax, Bak, Bad, Bid, ou les protéines anti-apoptotiques parmi lesquels Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W. La protéine Bcl-2 est surexprimée dans de nombreux types de cellule cancéreuse [Llambi *et Green.*,2011]. Lors que l'expression de Bcl-2 est réduite elle peut favoriser des réponses apoptotiques à des médicaments anticancéreux, l'augmentation de l'expression de Bcl-2 conduit à la résistance aux médicaments chimiothérapeutiques et à la radiothérapie.

Toute la famille Bcl-2 est composée d'un certain nombre de membres pro-apoptotiques tels que Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim. et Hrk, plus d'autres membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 et Mcl-1 [Engel *et Henshall* ,2009]. Cela conduit à la libération du cytochrome c et d'autre part des dérivatives mitochondriales activateurs des caspases ; la mitochondrie externe de la membrane devient perméable aux réponses des stimuli de l'apoptose, tandis que le cytochrome c peut interagir avec Apaf-1, une fois libéré dans le cytosol, il conduit à l'activation de la caspase-9 [Wen *et al.*, 2012]. La caspase-9 activée active la caspase-3, ce qui entraîne l'activation ultérieure de la cascade des caspases en aval finalement de générer l'apoptose.

✓ Protéine P-53

Le facteur de transcription nucléaire p53 peut gouverner des signaux apoptotiques dont les mitochondries reçoivent dans la voie intrinsèque de l'apoptose [Kastan *et al.*, 1991].

La protéine p53 est un facteur pro-apoptotique important et aussi un inhibiteur de tumeur, donc les médicaments antitumoraux peuvent exercer leurs fonctions en ciblant les voies de signalisation liées à la p53 qui favorise principalement la mort cellulaire apoptotique en activant un certain nombre de régulateurs de l'apoptose tels que DR-5 et Bax (**figure 07**) [Benchimol, 2001].

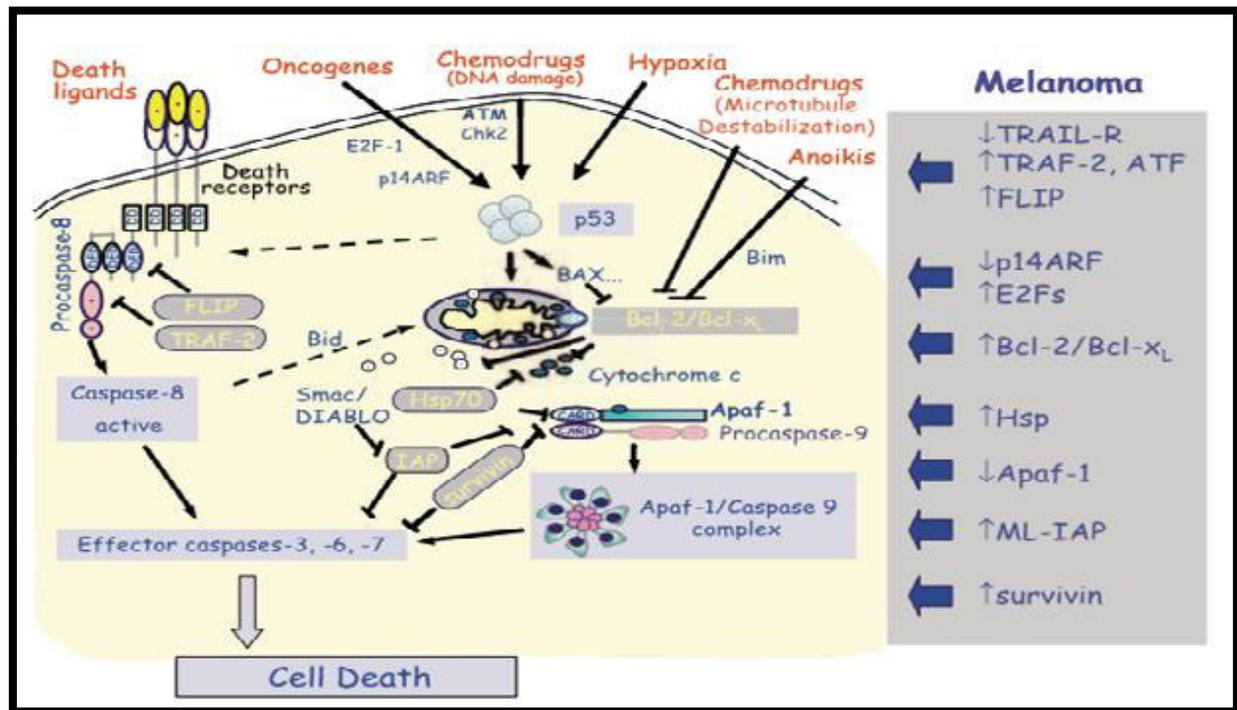


Figure 07. Schéma simplifié des voies apoptotiques (les multiples points de régulation des voies extrinsèques (récepteur membranaire de mort) et intrinsèque (mitochondriale) [Benchimol , 2001].

II.2. Cancer

II.2.1. Croissance et développement du cancer

L'une des caractéristiques fondamentales du cancer est la clonalité de la tumeur, le développement de tumeurs à partir de cellules uniques qui commencent à proliférer anormalement. L'origine unicellulaire de nombreuses tumeurs a été démontrée par l'analyse de l'inactivation du chromosome X (figure 09), un membre de la paire de chromosomes X est inactivé en étant converti en hétérochromatine dans les cellules femelles. L'inactivation de X se produit de manière aléatoire au cours du développement embryonnaire, de sorte qu'un chromosome X est inactivé dans certaines cellules, alors que l'autre chromosome X est inactivé dans d'autres cellules. Ainsi, si une femelle est hétérozygote pour un gène du chromosome X, différents allèles seront exprimés dans des cellules différentes [Cooper ,2000].

Les tissus normaux sont composés de mélanges de cellules avec différents chromosomes X inactifs, de sorte que l'expression des deux allèles est détectée dans les tissus normaux des femelles hétérozygotes. En revanche, les tissus tumoraux n'expriment généralement qu'un seul allèle d'un gène du chromosome X hétérozygote. L'implication que toutes les cellules constituant une telle tumeur provenaient d'une seule cellule d'origine, dans

laquelle le schéma d'inactivation X était fixé avant que la tumeur ne commence à se développer (Figure 08)[Cooper ,2000].

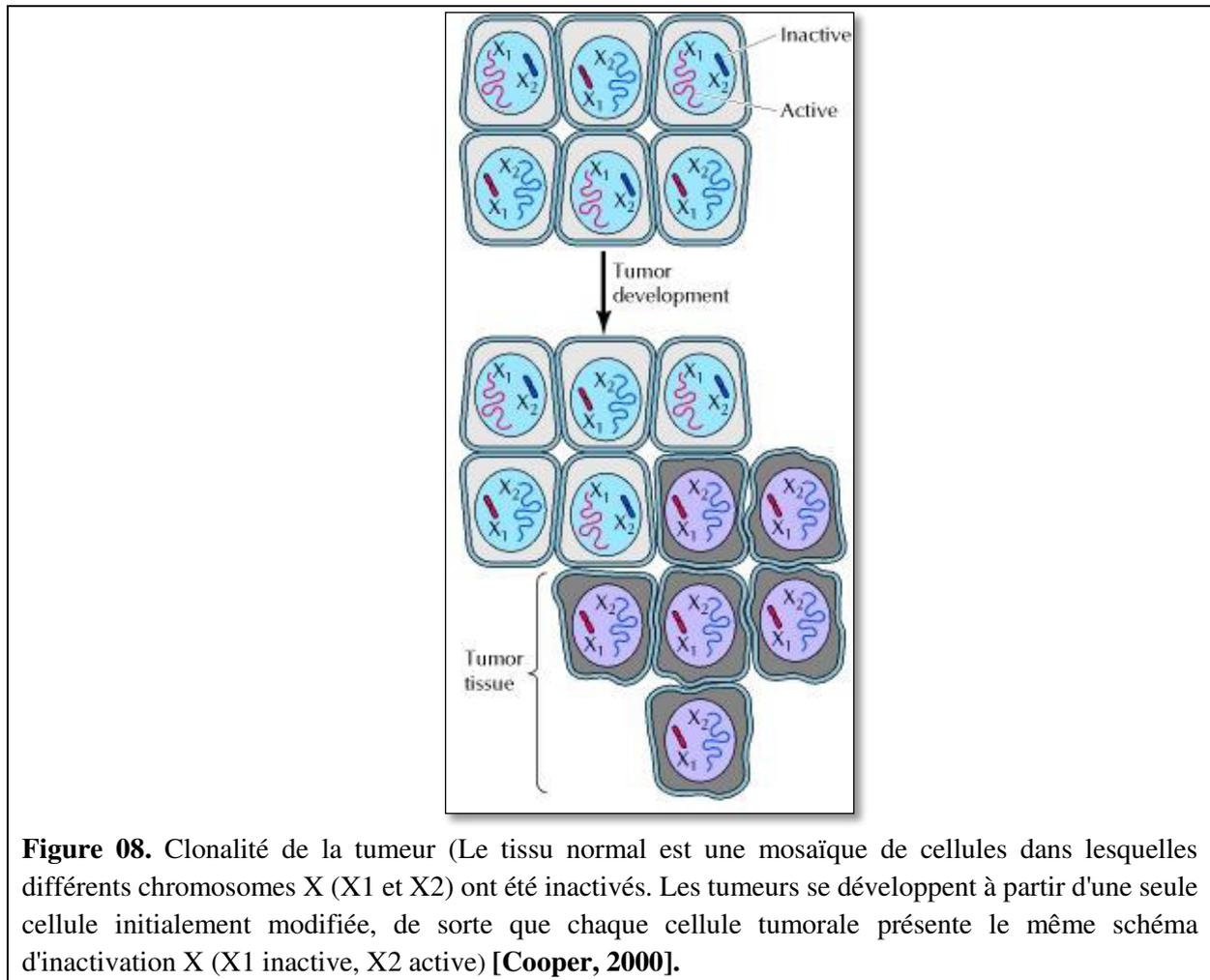


Figure 08. Clonalité de la tumeur (Le tissu normal est une mosaïque de cellules dans lesquelles différents chromosomes X (X1 et X2) ont été inactivés. Les tumeurs se développent à partir d'une seule cellule initialement modifiée, de sorte que chaque cellule tumorale présente le même schéma d'inactivation X (X1 inactive, X2 active) [Cooper, 2000].

Au niveau cellulaire, le développement du cancer est considéré comme un processus qui comprend plusieurs étapes qui impliquent la mutation et la sélection des cellules avec une capacité d'augmentation progressive de la prolifération et cela guide à la survie, l'invasion et la métastase (Figure 09). La première étape de ce processus commence par l'initiation de la tumeur qui serait le résultat d'une altération génétique conduisant à une prolifération anormale d'une seule cellule. La prolifération cellulaire conduit alors à l'excroissance d'une population de cellules tumorales dérivées par clonage.

La progression tumorale se poursuit alors que des mutations supplémentaires se produisent dans les cellules de la population tumorale. Certaines de ces mutations confèrent un avantage sélectif à la cellule, comme une croissance plus rapide, et les descendants d'une cellule portant une telle mutation deviendront par conséquent dominants dans la population tumorale. Le processus est appelé sélection clonale, car un nouveau clone de cellules tumorales a évolué sur la base de son taux de croissance accru ou d'autres propriétés (telles que la survie, l'invasion

ou la métastase) qui confèrent un avantage sélectif. La sélection clonale se poursuit tout au long du développement tumoral, de sorte que les tumeurs deviennent continuellement plus rapides et de plus en plus malignes [Cooper ,2000].

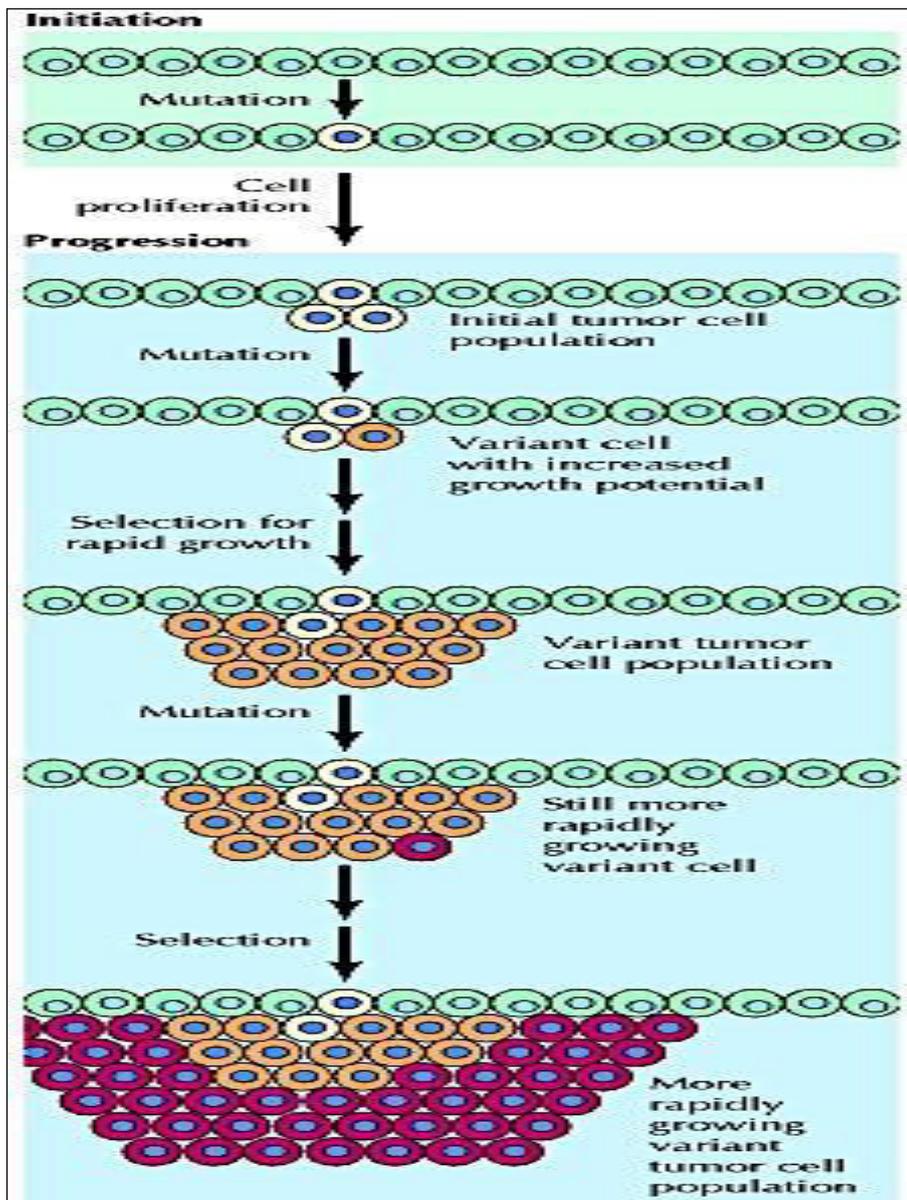


Figure 09. Les étapes du développement de la tumeur. Le développement du cancer débute lorsqu'une seule cellule mutée commence à proliférer anormalement. Des mutations supplémentaires suivies d'une sélection pour des cellules à croissance plus rapide au sein de la population entraînent alors une progression de tumeur [Cooper ,2000].

II.2.2. Agent causateurs du cancer

Les cancérogènes chimiques en particulier ont été étudiés depuis plus d'un siècle même si une grande partie des études précédentes n'a pas mis en évidence les produits chimiques responsables de l'oncogénèse ou cibles cellulaires. Des études épidémiologiques précoces et

l'expérimentation animale met en lumière le potentiel cancérigène qui, à leur tour, ont été utilisés pour limiter l'exposition de ces produits chimiques au public. L'exposition à ces agents cause généralement un cancer dans les régions où il y a beaucoup de surface comme la peau, les poumons et tractus gastro-intestinaux [Hecht ,2006].

Finalement, la recherche a commencé à se concentrer sur les changements génétiques associés au cancer. Les cancérigènes ont été classés en groupes associés à leur structure moléculaire similaire et mécanismes associés à la carcinogénèse. Aaron *et al.*, (2014) ont constaté que les agents intercalants perturbent l'activité cellulaire associée à la réplication de l'ADN, la transcription, et la stabilité du chromosome.

II.2.2.1. Tabac

L'usage du tabac est connu pour contribuer au développement de nombreuses formes de cancers, y compris les cancers du poumon, de la vessie, de l'intestin et de la bouche. Il y a divers agents cancérigènes trouvés dans le tabagisme, dont les hydrocarbures aromatiques polycyclique (HAP), les nitrosamines et amines aromatiques [Hecht ,2006]. La fumée de cigarette seule a plus de 5 000 constituants chimiques connus [Rodgman et Perfett ,2009; Hecht ,2012].

Cependant, les agents carcinogènes sont beaucoup plus étroits aux 73 agents cancérigènes connus dans le tabac [Rodgman et Perfett ,2009 ; Hecht, 2012] et les 28 cancérigènes connus dans mâcher du tabac et du tabac à priser. Sur les 73 connus cancérigènes dans la fumée du tabac, 20 sont connus des cancérigènes des poumons. Ces cancérigènes pulmonaires comprennent les HAP, la nitrosamine cétone dérivée de la nicotine (NNK) , le cadmium, l'isotope radioactif 210P et les produits chimiques volatiles comme le 1,3-butadiène [Hecht, 2012].

La nicotine se retrouve dans les trois formes de l'usage du tabac. Bien que la nicotine n'ait pas propriétés mutagènes, il a la capacité d'inhiber l'apoptose qui est une partie importante de tumorigénèse en plus d'agir comme agent tumoral en augmentant l'activité de la protéine kinase. Le cytochrome P450 peut activer la nicotine dérivée de cétone nitrosamine comme cancérigène via CYP2A6 [Hecht *et al.*, 2006].

Les cancérigènes sont fabriqués plus hydrophiles lorsqu'ils sont métabolisés par le cytochrome P450, S-transférases de glutathion et UDP glucuronosyl transférases et deviennent essentiellement un des espèces plus réactives qui peuvent interagir avec des sites nucléophiles d'ADN qui peuvent former de l'ADN produits d'addition. Ces adduits d'ADN, s'ils ne sont pas

réparés, peuvent conduire à des changements aberrants lors de la polymérisation conduisant à un polymorphisme nucléotidique permanent qui peut contribuer à l'oncogénèse.

II.2.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des cancérogènes connus avec des niveaux variables de cancérogénicité et de toxicité (tableau 2). Les HAP sont retrouvés dans des mélanges complexes dans l'environnement, fumée de cigarette, échappement des véhicules.

Le principal mécanisme de la carcinogénèse induite par les HAP implique la liaison des HAP à l'ADN. Ce processus peut d'abord impliquer le PAH pour devenir activé après il est métabolisé par CYP1A1, 1A2 et 1B1 [Shimada *et al.*, 2004]. La capacité mutagène et tumorigène de HAP est de se lier à l'ADN ou en dépurant l'ADN laissant des sites abasiques [Szeliga et Dipple, 1998]. Le potentiel mutagène peut soit activer les oncogènes ou inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs.

Les HAP ont la capacité d'inactiver la tumeur P53 gène suppresseur comme il est découvert dans le cancer du poumon et du sein [Hussain *et al.*, 2001 ; Mordukhovich *et al.*, 2010]. En plus la désactivation de P53, le proto-oncogène RAS peut être activés par des mutations associées aux HAP observé *in vivo* [Gray *et al.*, 2001].

II.2.2.3. Pesticides

Il y a plusieurs pesticides organochlorés cancérigènes avec divers mécanismes associés avec l'oncogénèse. Le chlorotriazine terbuthylazine induit des dommages à l'ADN des lymphocytes humain en plus effectue l'intégrité du gène TP53 et le proto-oncogène c-myc [Mladinic *et al.*, 2012].

Le β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) est un pesticide qui augmente l'expression de l'ARNm de la matrice metalloproteinase MMP-13 ainsi augmenter l'expression de proto-oncogènes cycline D1, p27 et c-Neu et peut également accélérer la croissance de tumeurs mammaires dans des modèles murins [Wong et Matsumura, 2007].

L'activation de protooncogènes c-myc, c-jun et c-fos et l'induction de l'activité de la PKC par l'hexachlorobenzine peut causer des tumeurs dans le foie en plus de sa toxicité [Randi *et al.*, 2003].

II.2.2.4. Radiations

Il y a des spéculations dont le rayonnement est la cause racine pour 10% de tous les cancers. Une grande partie de là en ce qui concerne les rayonnements, étaient basées sur des études de rayonnement ou l'exposition aux radiations suivant détonation nucléaire des bombes atomiques à Hiroshima et Nagasaki. Le rayonnement est connu pour son induction de la leucémie et lymphome, cancer de la peau, le cancer de la thyroïde, divers sarcomes, cancer des poumons et du sein [Wakeford, 2004]. Ceux qui sont les plus susceptibles d'être exposés aux radiations comprennent les radiologues et les mineurs.

Darby *et al.*, (2005) ont montré que 10% des cancers du poumon peuvent être associés à l'exposition au radon de la vie dans une zone ou travaillant dans un domaine associé à des niveaux élevés du radon. En effet, le cancer causé par les rayonnements non ionisants est largement causé par l'exposition aux rayons ultraviolets (UV). L'exposition aux UV dépend de la dose, ce qui est un facteur de risque pour les cancers de la peau, y compris les cellules basales et le carcinome épidermoïde ainsi que le mélanome [Foliart *et al.*, 2006].

II.2.2.5. Microorganismes

Différents types de micro-organismes sont connus pour provoquer le cancer. Ces micro-organismes comprennent les virus, les bactéries, les trématodes et les champignons.

Les mécanismes des virus pour causer le cancer impliquent généralement l'insertion de matériel génétique dans les chromosomes dans les gènes oncogéniques ou les gènes de tumeur supprimeurs. D'autres virus ont des protéines oncolytiques et certains provoquent une inflammation qui est associé à l'oncogénèse. Ces virus comprennent le virus d'Epstein Barr (EBV), le virus de l'hépatite B (VHB), Virus de l'hépatite C (VHC), Herpès humain Virus 6 (HHV-6), virus de l'herpès humain 8 (HHV-8), Papillomavirus humain (HPV), cellule T humaine [Sun *et al.*,2003].

Le virus de la leucémie de type 1 (HTLV-1) et la cellule de Merkel Polyomavirus (MCPyV) (tableau 4). EBV est généralement asymptomatique, mais il a le potentiel de provoquer le Lymphome de Hodgkin, lymphome de Burkitt,.....etc [Boshoff *et al.*, 1995].

Chapitre III
BIOThERAPIE DU
CANCER

III.1. Produits anti-tumoraux d'origine non végétaux

Les organismes marins et les algues offrent de riches sources d'agents anti-cancéreux avec des composés bioactifs structurellement divers et des métabolites secondaires bioactifs qui présentent diverses activités antitumorales dont la plupart des produits ont été d'abord découverts à l'aide d'antibiotiques, dont l'activité antitumorale est importante.

L'activité antitumorale de médicaments antinéoplasiques naturels ne permet pas de tuer directement les cellules, mais elle permet d'atteindre la fonction immunitaire ou d'atteindre tout les deux. La division et la duplication permettent de réduire les effets indésirables sur le cycle de vie et la régulation de la circulation sanguine a un effet sur le développement du cancer [Wang et Ren, 2010].

III.2. Produits anti-tumoraux d'origine végétale

Depuis plus de 40 ans, les produits naturels nous ont servi bien dans la lutte contre le cancer. Les principales sources de ces composés sont des microbes et des plantes de diverses parties, des antitumoraux microbiens, Epothilones, les agnets angiogéniques [Demain *et al.*, 2011].

Les produits naturels dérivés des fruits, des légumes, des herbes et des produits de la mer nous ont bien servis dans la lutte contre plusieurs types de cancer. Les composés sont bien caractérisés comme possédant une grande variété de propriétés anti-tumorales par divers mode d'action : l'induction de l'apoptose, l'autophagie et l'inhibition de la prolifération cellulaire. Les ingrédients actifs tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, le polysaccharide et la saponine obtenus à partir de produits naturels ont des propriétés anti-tumorales, analgésiques, anti-inflammatoires, immunomodulatrices, antivirales...etc [Zhang *et al.*, 2013].

III.2.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes Vinca monoterpène indole, tels que la vinblastine et vincristine, La vinblastine est couramment utilisée pour traiter les cancers tels que le lymphome de Hodgkin. La Vinblastine et vincristine ont montrées des activités pharmacologiques importantes [Bernhardt *et al.*, 2007].

La camptothécine est un alcaloïde monoterpène indole modifié produit par certaines plantes (angiospermes), la camptothécine action en ciblant dans la cellule l'ADN topoisomérase de type I. Lorsque les patients deviennent résistants au traitement par l'irinotecan, son

utilisation peut être prolongée par ça combinant avec l'anticorp monoclonal Erbitux (Cetuximab) [Lorence *et al.*, 2004].

Erbitux (R) bloque la protéine qui stimule la croissance tumorale et la combinaison aide les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Cette protéine est exprimée dans 80% des colorectaux métastatiques avancés [Puri ,2017].

Zhang *et al.*, (2012) ont signalé que la 10-méthoxy-9-nitrocamptothécine avait une puissante activité antitumorale sur les cellules A549 *in vitro* et *in vivo* ; arrêt du cycle cellulaire induit G2 / M en fonction du temps et de la dose d'une thérapie anticancéreuse.

Matrine est l'un des composants majeurs de l'extrait de *Sophora flavescens Ait*, dont il a été démontré pour exercer des effets anticancéreux dans une large gamme de cellules cancéreuses, y compris les cellules mammaires, gastriques, pulmonaires,..etc (Figure 10 et 12). Il peut inhiber la lignée cellulaire tumorale MNK45, induisant l'apoptose et l'autophagie. Les traitements conventionnels de la leucémie myéloïde aiguë (LAM) ont souvent des effets secondaires graves [Li *et al.*, 2013].

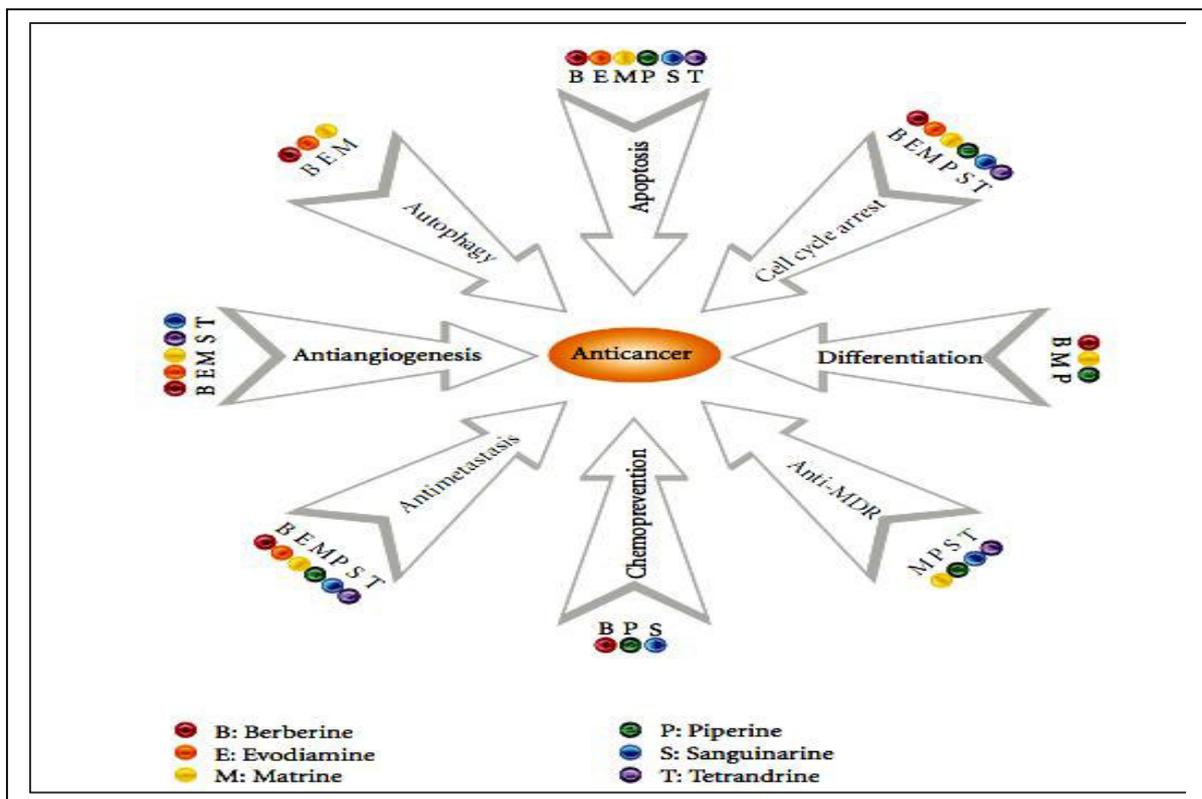


Figure 10. Berberine, evodiamine, matrine, piperine, sanguinarine et la tetrandrine , un -ensemble d'alcaloïdes qui repriment le cancer en induisant plusieurs voies de signalisation et entraînent l'inhibition de l'initiation de la cancérogenèse, induction de l'arrêt du cycle cellulaire , l'apoptose, l'autophagie , la différenciation et l'inhibition des métastases , l'angiogénèse [Lu *etal.*,2012].

Zhang et al., (2012) ont découvert que la matrine pouvait inhiber la prolifération et induire l'apoptose dans les lignées cellulaires AML en influençant sur le potentiel de la membrane mitochondriale par l'activation de l'expression des protéines Bax et les caspases 4, 3, 8 et 9.

Dans des études animales, il a été constaté que la tryptanthrine est un alcaloïde qui inhibe la croissance des cellules de neuroblastome humain et la prolifération des cellules JCS de la leucémie myéloïde murine WEHI-3B avec une dose de 50% et induit une différenciation neuronale des cellules LA-N-1 et une activité accrue de l'acétylcholine estérase [**Liao et al., 2013**].

Xu et al., (2012) ont utilisé des méthodes telles que le dosage de viabilité cellulaire MTT, le dosage d'ADN, les méthodes de western blot pour indiquer que la déshydrocorydaline isolée de *Corydalis yanhusuo* inhibe la prolifération des cellules MCF-7 en induisant l'apoptose médiée par Bax / Bcl-2, les caspases activantes et la PARP ; et ils ont démontré que la déshydrocorydaline possédait un potentiel anticancéreux sur les cellules du cancer du sein MCF-7 *in vitro*.

Des études ont montré qu'un alcaloïde bis-indole dérivé de l'éponge a une activité anti-VIH-1 et une activité antiproliférative contre de nombreuses lignées de cellules cancéreuses (par exemple, des dérivés de l'éponge) [**Bharate et al., 2012**].

FBA-TPQ est un alcaloïde marin isolé des éponges, a un effet antitumoral sur les cellules cancéreuses de l'ovaire humain. Des études *in vitro* et *in vivo* sur les effets antitumoraux ont montré que FBA-YPQ pouvait inhiber la croissance des cellules cancéreuses de l'ovaire humain et la prolifération ; induisent de façon puissante l'apoptose cellulaire et le plus fréquent des cycles G2 / M, etc. [**Chen et al., 2011**].

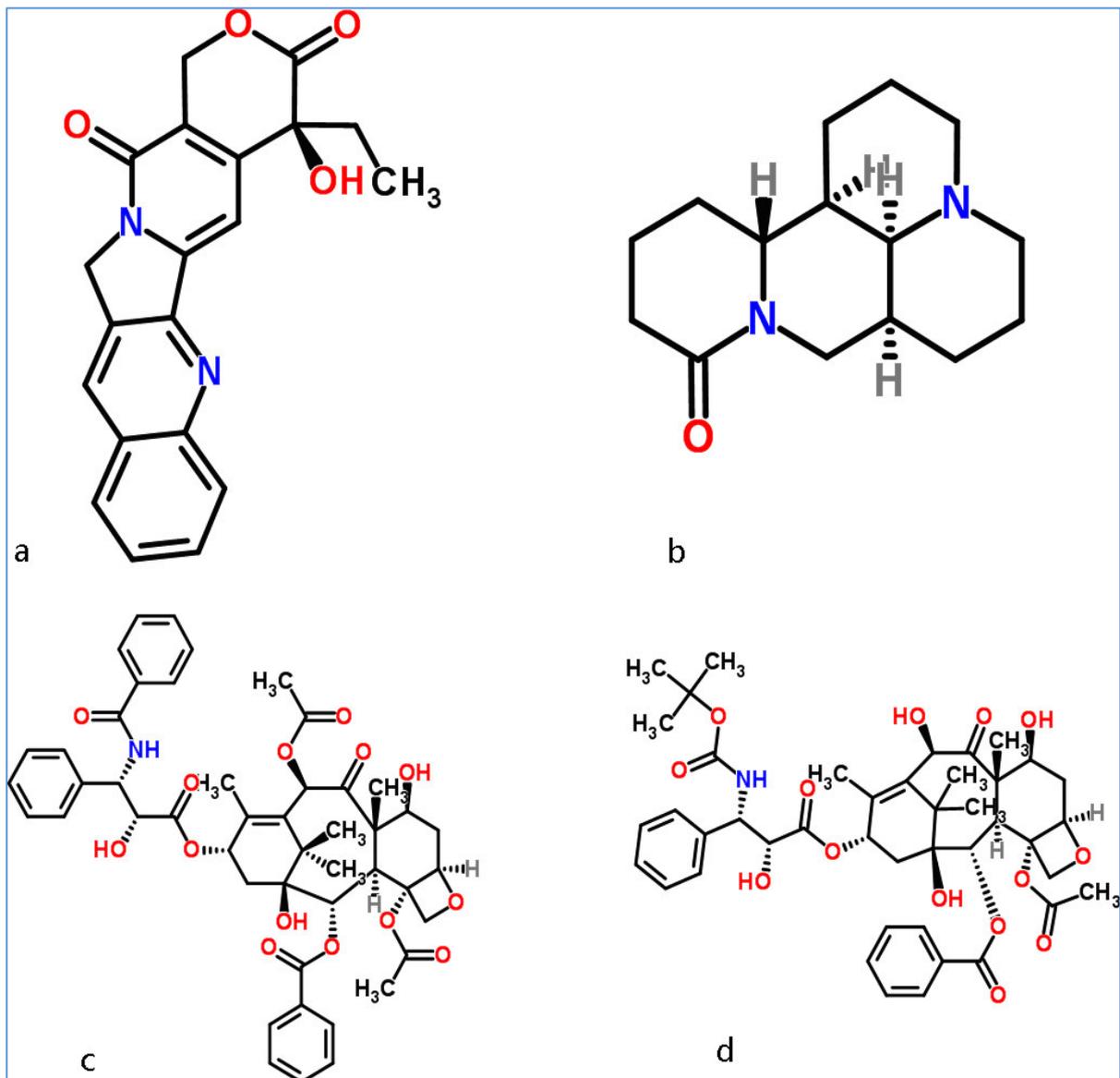


Figure 11. Structures chimiques de la camptothécine (a), de la matrine (b), du paclitaxel (c) et du docétaxel (d). [Kuramoto *et al.*, 2006].

III.2.2. Taxol

Taxol (paclitaxel), un alcaloïde diterpène, est une molécule anti-tumorale réussie. [Dejong *et al.*, 2005]. Il est d'origine végétale, mais également été trouvé comme un métabolite fongique [Stierle *et al.*, 1993].

Ils ont rapporté que le taxol est utilisé pour le cancer du sein et des ovaires, il agit en bloquant la dépolymérisation des microtubules. En outre, le taxol favorise la polymérisation de la tubuline et inhibe la division rapide des cellules cancéreuses [Manfredi et Horowitz, 1984].

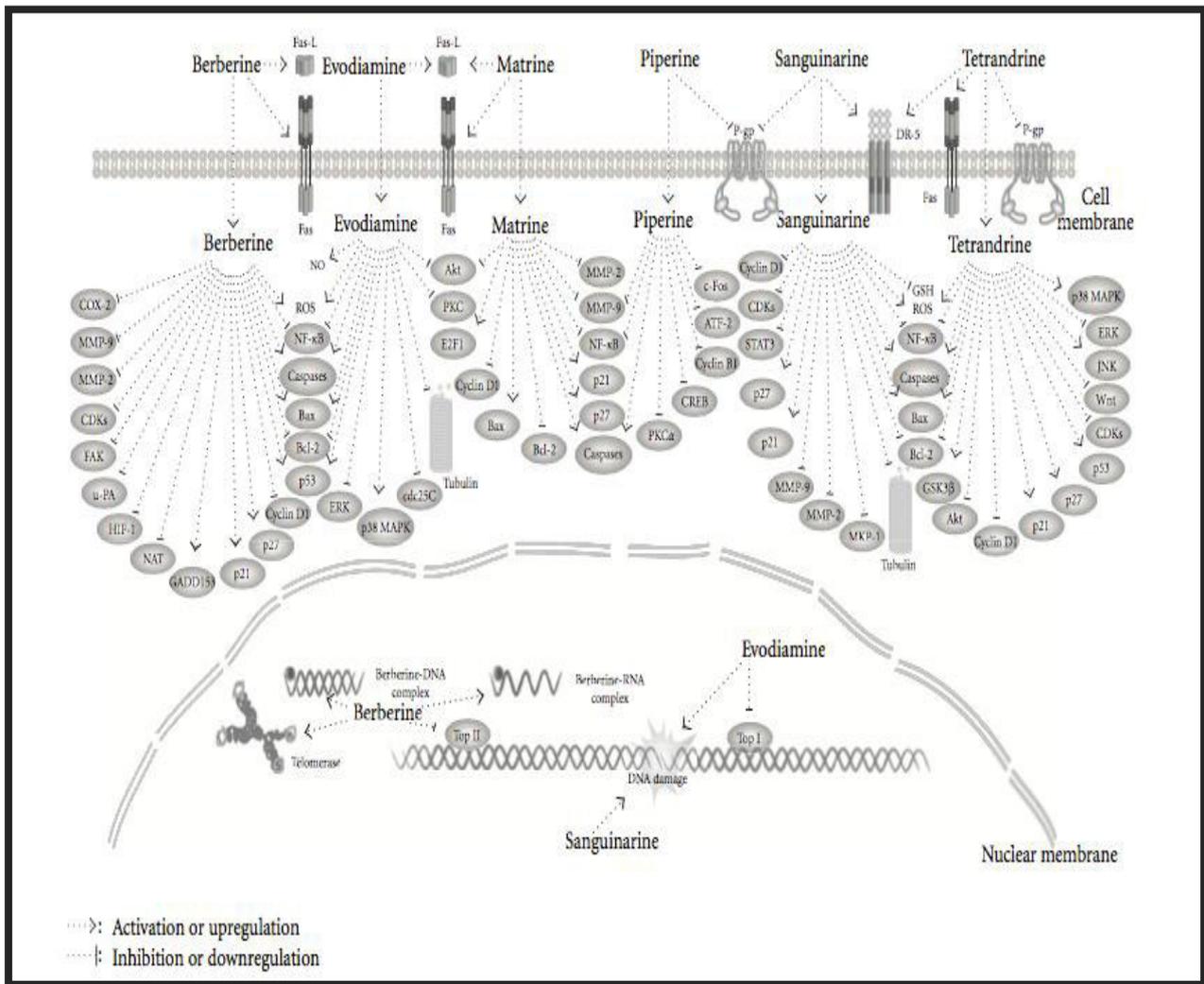


Figure 12. Schéma de la machinerie moléculaire et des cibles possibles pour les propriétés antinéoplasiques de certains alcaloïdes ainsi que la berbérine, de l'évodiamine, de la matrine, de la pipérine, de la sanguinarine et de la tétrandrine. **ATF-2:** facteur de transcription activé 2; **Bax:** protéine X associée à **Bcl-2**; **Bcl-2:** lymphome à cellules B 2; **CDK:** kinases dépendantes des cyclines; **COX-2:** cyclooxygénase 2; **CREB:** réponse à l'élément cAMP; **DR-5:** récepteur de mort 5; **ERK:** kinase régulée par le signal extracellulaire; **FAK:** kinase d'adhésion focale; **Fas-L:** Fas ligand; **GADD153:** arrêt de croissance et gène 153 inductible par lésion de l'ADN; **GSH:** glutathion; **GSK3β:** glycogène synthase kinase 3β; **HIF-1:** facteur 1 inductible par l'hypoxie; **MKP-1:** protéine kinase phosphatase 1 activée par un mitogène; **MMP-2:** métalloprotéinase matricielle 2; **MMP-9:** métalloprotéinase matricielle 9; **NAT:** N-acétyltransférase; **NF-κB:** facteur nucléaire κ-amplificateur de chaîne légère de cellules B activées; **NSA:** oxyde nitrique synthase; **p38 MAPK:** p38 protéine kinase activée par un mitogène; **PKC:** protéine kinase C; **P-gp:** P-glycoprotéine; **ROS:** espèces réactives de l'oxygène; **STAT-3:** transducteur de signal et activateur de la transcription 3; **TopI:** topoisomérase I; **TopII:** topoisomérase II; **u-PA:** activateur du plasminogène de type urokinase [in-Jian Lu *et al.*,2012].

III.2.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes comprennent les isoflavones, les flavonols, les flavones, les anthocyanidines, les catéchines, les flavanones..... etc. Des études ont montré que les flavonoïdes ont des effets anticancéreux [Hsu *et al.*, 2011].

La réglisse (*Glycyrrhiza glabra L*) est une plante médicinale chinoise courante et des études ont montré que la liquiritigénine qui est le principal flavone composé de cette plante peut inhiber efficacement la prolifération de cellules de carcinome cervical humain de xénogreffes de tumeurs chez la souris nue [Liu *et al.*, 2012].

Licochalcone A est un phénol naturel qui a également des effets contre le cancer gastrique. Il inhibe le cycle cellulaire et induit l'apoptose cellulaire dans les cellules cancéreuses [Xiao *et al.*, 2011]. Il a un effet inhibiteur dans le cancer du sein humain. Il inhibe les métastases cellulaires, diminue l'angiogenèse tumorale et inhibe l'invasion des cellules MDA-MB-231 [Hsu *et al.*, 2011].

Baicalin est un flavone glycoside qui possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-tumorales (Figure 12g). Dans une étude sur un carcinome hépatocellulaire humain (CHC), Zhang *et al.*, (2012) ont découvert qu'un autre flavone qui est la baicaline pouvait induire la mort cellulaire autophagique en régulant à la baisse la CD147 dans la lignée cellulaire SMMC-7721. Le traitement combiné de baicalin et baicalein a un effet anti-prolifératif synergique, en augmentant l'activité apoptotique et réduit le niveau d'expression de bcl-2.

Dans ce contexte, il est trouvé que l'association de la baicaline avec la baicaleine ont significativement inhibé la viabilité des cellules cancéreuses de l'ovaire. Les deux pourraient inhiber la viabilité des cellules cancéreuses et l'expression des facteurs cellulaires [Zhou *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2013].

Les isoflavones existent principalement dans les légumineuses, avec une structure similaire à celle des œstrogènes, y compris les isoflavones de soja, les gènesisoflavones, etc. Le phénoxodiol, un nouveau dérivé des isoflavones, induit l'apoptose *in vitro* et *in vivo*, même dans les cellules cancéreuses chimio-résistantes [Alvero *et al.*, 2008].

La quercétine est un flavonoïde dérivé de plantes qui peut inhiber la croissance et l'induction de l'apoptose dans plusieurs types de cellules tumorales, comme le cancer du col de l'utérus, le cancer de la prostate, le cancer buccal surexprimant, l'ostéosarcome, etc [Hsu *et al.*, 2013].

Le resvératrol et la quercétine en combinaison ont inhibé la croissance des cellules CLL humaines par des effets cytotoxiques, cytostatiques et apoptotiques, et ont également un effet sur les cellules cancéreuses du côlon HT-29 [Del Follo-Martinez *et al.*, 2013].

La propolis contient une variété de composés. L'ester phénéthylque de l'acide caféique (ACEP) est un composant bioactif puissant extrait de la propolis. La recherche pharmacologique moderne a prouvé que le CAPE peut supprimer la prolifération cellulaire du

cancer du pancréas humain, peut adjuver le carcinome épidermoïde oral humain, inhiber la croissance des cellules cancéreuses et la signalisation protéine kinase Akt dans les cellules cancéreuses humaines de la prostate, et avoir un effet sur les cellules cancéreuses cervicales [Chenet *et al.*, 2013, Kuo *et al.*, 2013].

De nombreux autres flavonoïdes tels que la rutine, l'épigallocatechine, la silymarine, ont également une activité anticancéreuse et des mécanismes moléculaires spéciaux sont étudiés (figure 13 et 14) [Linnet *et al.*, 2013].

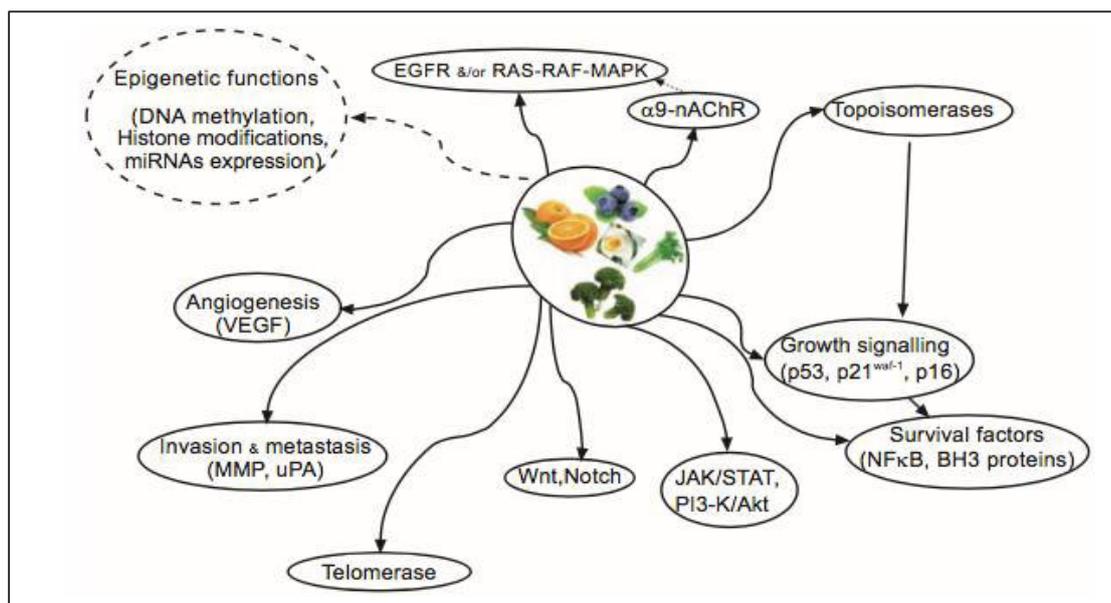


Figure 13. Différents trajets et les voies moléculaires régulés par les flavonoïdes [Russo *et al.*, 2012].

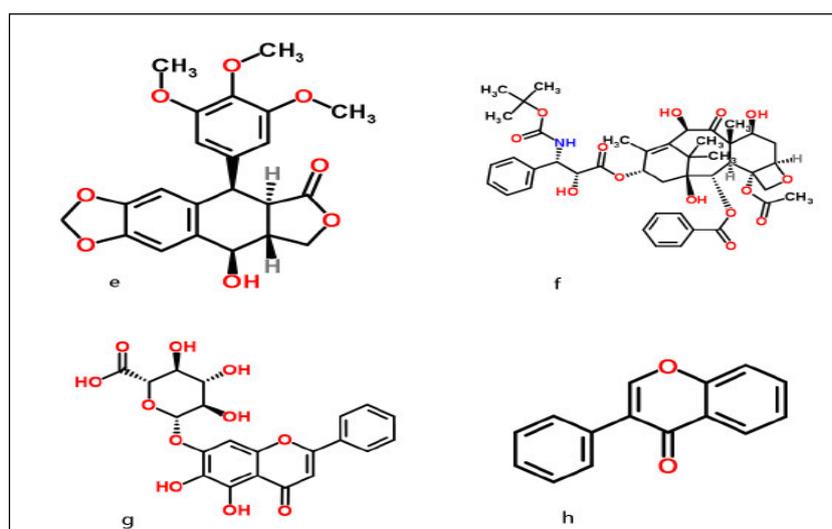


Figure 14. Structures chimiques de la podophyllotoxine (e), de la licochalcone A (f), de la baicaline (g) et des isoflavones (h). [Renouard *et al.*, 2011].

III.2.4. Saponines

Il a été rapporté que les saponines possèdent diverses propriétés biologiques telles qu'une activité anticancéreuse et anti-inflammatoire. Le plus largement étudié est le ginsenoside.

Le Ginsenoside est une sorte de triterpénoïde saponin, et un des ingrédients actifs principaux dans le ginseng. Un grand nombre d'études ont montré que le ginsenoside a une activité antitumorale supérieure, des effets secondaires non toxiques sur les cellules normales et a un effet synergique avec d'autres médicaments de chimiothérapie tels que le cisplatine. Le ginsenoside régule la prolifération des cellules tumorales, induisant la différenciation et l'apoptose des cellules pour exercer des effets anti-tumoraux [Shen *et al.*, 2009].

Ginsenoside Rg3 et ginsenoside Rh2 sont les composants antitumoraux les plus étudiés et les plus pertinents. Des études ont prouvé que Rg3 peut promouvoir le TRAIL (Ligand Inducteur de l'Apoptose TnfRelated) en induisant l'apoptose de la lignée cellulaire du carcinome hépatocellulaire. Cependant pas dans les hépatocytes normaux, et peut être utilisé comme chimiosensibilisant pour le traitement du cancer, et aussi avoir un effet sur le gliome et sur d'autres cancers hypathocytaires [Lee *et al.*, 2013].

Ginsenoside Rh2 peut traiter la leucémie en bloquant le cycle cellulaire ; traiter le cancer du pancréas en inhibant la prolifération, la migration, l'invasion et l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses [Tang *et al.*, 2013].

Le ginsenoside Rk1 a une activité antitumorale sur les cellules HepG2 du carcinome hépatocellulaire humain *in vitro*. RK1 est inhibé de façon marquée l'activité de la télomérase et la croissance cellulaire ainsi qu'un changement morphologique significatif et une apoptose induite [Kim *et al.*, 2008].

Les métabolites de Rg3, inhibent la croissance et la prolifération des cellules du cancer de la prostate, induit une apoptose qui conduit à un arrêt dans la phase G1 du cycle cellulaire. Par conséquent, il pourrait fonctionner comme un agent thérapeutique potentiel dans le traitement du cancer de la prostate et il a également des effets plus forts sur le cancer du côlon [Wang *et al.*, 2008 ; Gao *et al.*, 2013].

Le métabolite triterpène saponine de ginsenoside K trouvé dans les racines de la plante peut inhiber une variété de croissance de cellules cancéreuses. Il peut améliorer les résultats du traitement de la leucémie myéloïde aiguë pédiatrique et des expérimentations animales ont

montré que le composé K peut également avoir un effet de prévention et de traitement du cancer du côlon [Chen *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013].

Yun *et al.*, (2013) ont découvert que le dérivé de ginsenoside R_{p1} a l'effet d'une multirésistance aux médicaments. Beaucoup d'autres saponines ont une activité anticancéreuse.

III. 2.5. Polysaccharides

Les polysaccharides jouent un rôle antitumoral par une variété d'approches et le niveau de participation et de régulation dans le système immunitaire, tels que la régulation de la fonction phagocytaire du système réticulo-endothélial, améliorer l'activité des cellules tueuses naturelles (NK), activer les macrophages, induire l'expression des facteurs immuno-régulateurs métabolisme, inhiber le cycle cellulaire tumoral, inhiber l'activité de la SOD dans les tissus tumoraux, etc. La masse moléculaire relative du polysaccharide neutre peut améliorer la fonction du macrophage *in vivo*, le polysaccharide acide peut favoriser la libération du facteur de nécrose tumorale, tuer et inhiber directement les cellules tumorales (Figure 15 3k).

Il a été démontré que le polysaccharide dérivé de *Prunella vulgaris* possède des activités anti-HSV en inhibant la liaison et la pénétration du virus dans les cellules hôtes [Zhang *et al.*, 2007].

Astragalus polysaccharides (APS) sont les ingrédients actifs dans *Astragalus membranaceus*. Lorsqu'il est utilisé seul, l'APS n'a pas d'activité anti-tumorale sur les cellules tumorales *in vitro*. Cependant, il peut être combiné avec d'autres médicaments contre le cancer pour augmenter la cytotoxicité de certains médicaments de chimiothérapie dans les cellules H22 / ADM et améliorer la chimio-sensibilité des cellules [Tian *et al.*, 2012].

Ganoderma lucidum ont été utilisés pour prévenir et traiter diverses maladies humaines. Les données obtenues par des recherches antérieures ont montré que le polysaccharide de (GLPS) *G. lucidum* pouvait supprimer la tumorigenèse ou inhiber la croissance de la tumeur par des effets cytotoxiques directs et des actions anti-angiogéniques. Il peut médier immunomodulation et affecter les cellules immunitaires et; les cellules immunitaires [Xu *et al.*, 2011].

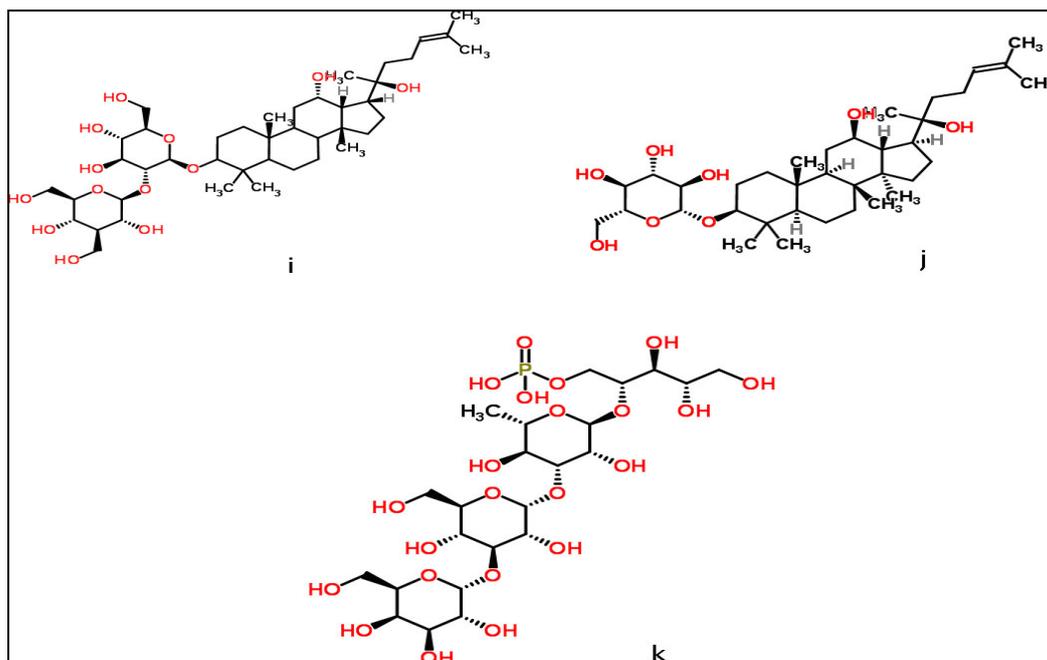


Figure 15. Structures chimiques du ginsenoside Rg3 (i), Rh2 (j) et polysaccharide (k).
[kimet *et al.*, 2008].

III.2.6. Polyphénols

Les composés phytochimiques polyphénoliques constituent l'une des classes de métabolites secondaires les plus omniprésentes dans la nature. Jusqu'à présent, il existe de nombreuses informations sur les mécanismes moléculaires par lesquels les polyphénols peuvent affecter la cancérogenèse, la prolifération et la mort des cellules tumorales, l'inflammation, l'angiogenèse et la résistance aux médicaments [Kanget *et al.*, 2011].

Fréquemment, les mécanismes moléculaires induits par les polyphénols englobent plusieurs voies ; l'induction d'enzymes antioxydantes en réduisant ainsi les ROS (espèces réactives de l'oxygène), les polyphénols induisent aussi une cancérogenèse via un facteur de transcription sensible au redox érythroïde 2 p45 (NF-E2) (Nrf2), un régulateur principal de la transcription de nombreuses enzymes détoxifiantes [Nair *et al.*, 2006]. Plusieurs études suggèrent également que certains polyphénols induisent la mort cellulaire en se liant aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xL ou en altérant le cytosquelette des microtubules cellulaires [Mena *et al.*, 2012].

III.2.7. Autres

Il existe de nombreux types de produits naturels qui possèdent une activité anticancéreuse.

L'andrographolide (Andro), une diterpénoïde naturelle lactone isolée à partir d'*Andrographis paniculata*, a été montré pour inhiber la prolifération des cellules du cancer du

sein, la migration et l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2 / M; et induisent également l'apoptose par une voie indépendante de la caspase. Il peut agir comme agent antitumoral et anti-angiogénique efficace pour le traitement du cancer du sein [Kumar *et al.*, 2012].

Les lactones sesquiterpéniques (SL) sont des métabolites secondaires végétaux ; testent deux molécules SL, le 3- β -méthoxy-iso-seco-tanaparholide (β -tan) et le salograviolide A (Sal A) de leur activité antitumorale ont montré qu'ils pouvaient inhiber sélectivement la croissance de la cellule induite par le promoteur tumoral des cellules JB6P + à des concentrations [Saikali *et al.*, 2012].

Trichosanthine (TCS) de 27 kDa est une protéine inactivatrice de ribosome trouvée dans la plante chinoise : *Trichosanthes kirilowii maximowicz* (TianHua Fen), a des activités anti-prolifératives et induisant l'apoptose dans les cellules MCF-7 humaines oestrogéno-dépendantes et MDA-MB indépendant des oestrogènes -231 cellules, et réduit significativement le volume et le poids de la tumeur [Fang *et al.*, 2012].

Zhao *et al.*, (2012) ont trouvé un complexe polysaccharide-protéine de *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch, qui peut inhiber la croissance tumorale *in vivo* en améliorant la réponse immunitaire antitumorale et en réduisant la voie métabolique des AA. Il a été démontré que les polyphénols polymériques de thé noir (PBP) possèdent l'effet anti-tumoral [Kumar *et al.*, 2012].

Un nouvel alcaloïde CS-1 a été extrait de la médecine traditionnelle chinoise qui peut probablement inhiber le facteur de croissance épidermique se liant à son récepteur ; influencer sur la transcription et l'arrêt du cycle cellulaire de la cycline D1 en phase G1 / S, de façon à inhiber la prolifération de plusieurs cellules cancéreuses humaines [Du *et al.*, 2012].

La doxycycline peut exercer ses effets anti-tumoraux en inhibant la voie de signalisation FAK [Sun *et al.*, 2009].

La naringénine peut améliorer l'effet antitumoral de la doxorubicine en modulant sélectivement les voies d'efflux de médicament mieux que la doxorubicine seule, et peut être développée comme adjuvant dans le traitement des cancers humains [Zhang *et al.*, 2009]. Ces analogues de bêta-lactame N-alkylthiolés peuvent être utilisés comme médicaments anticancéreux potentiels. Frezza *et al.*, (2008) ont découvert que les bêta-lactamines ont une activité induisant l'ADN et induisant l'apoptose sur différentes lignées cellulaires tumorales, et peuvent inhiber la croissance de souris porteuses de xénogreffes de cancer du sein associées à l'induction de lésions de l'ADN et d'apoptose dans les tumeurs.

Partie expérimentale

CHAPITRE I

Matériel et Méthodes

I.1. Etude phytochimique de la plante *H.albus*

I.1.1. Matériel végétal

La partie aérienne de la plante *Hyocamus albus* a été récoltée pendant la période Mars – Avril 2014 à partir de la région Nouader Ighzar n aith Abdi, Wilaya de Batna (Aures Algérie), cette plante a été identifiée par Dr OUDJHIH B, Laboratoire de Botanique, Département d'Agronomie, Université de Batna-1, un spécimen vaucher a été déposé sous le numéro 564DZUB2009.

La plante a été prudemment lavée et séchée à l'ombre pendant 65 jours dans une chambre sèche pour la préparer à l'extraction. Après séchage de la plante, les feuilles sèches ont été broyées au niveau de département de chimie pour obtenir une poudre fine.

La poudre a été sauvegardée à la température ambiante pour toutes utilisations.

I.1.2. Préparation des extraits

I.1.2.1. Extraction

La poudre fine du matériel végétal est soumise à un épuisement continu, en utilisant trois solvants à polarité croissante : (**Figure 16**)

1- **Ether de pétrole** : solvant apolaire aprotique ($\text{CH}_3\text{-CH}_{2n}\text{-CH}_3$)

2- **Chloroforme** : CHCl_3

3- **Méthanol** : CH_3OH

La méthode d'extraction suivie est effectuée selon le protocole de **Diallo et al., (2004)**

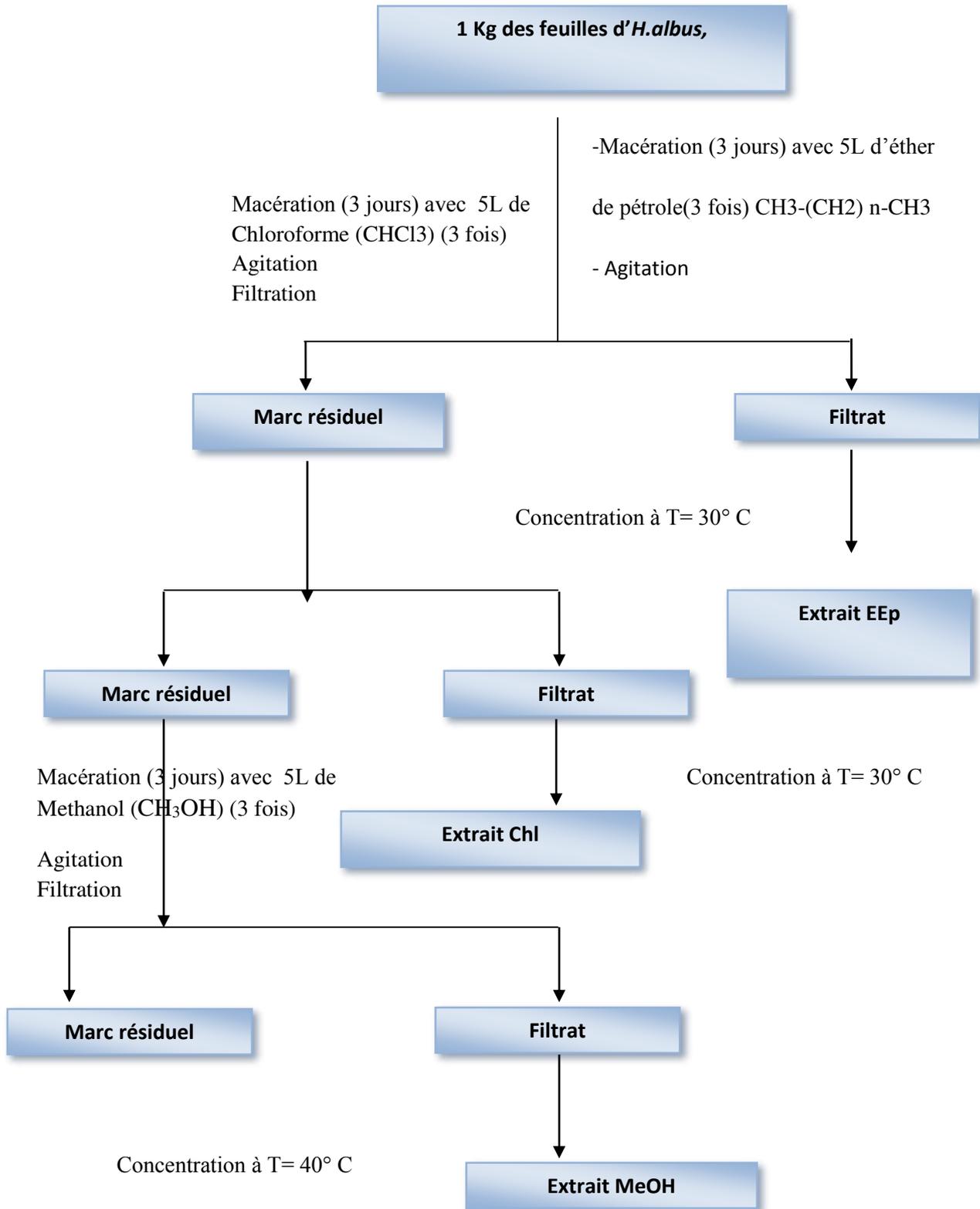


Figure 16. Schéma d'extraction par les solvants organiques des feuilles d'*H.albus* [Diallo *et al.*, 2004].

I.1.3. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement est calculé selon la méthode décrite par **Pratima et Mathad, 2011**, selon la formule suivante :

Rendement d'extraction (%) = poids d'extrait obtenu \times 100 / poids prise du matériel végétal.

I.1.4. Analyse des extraits d'*H. albus*

I.1.4.1. Tests préliminaires

Les tests préliminaires sont un standard utilisés dans chaque protocole de caractérisation de molécules, ils ont déjà été réalisés dans plusieurs études récentes et nous avons refait ces tests pour la confirmation de la présence des métabolites.

Métabolite secondaire	Principe de test	Résultat	Référence
Flavonoïdes	1 ml d'extrait + 0.2 ml d'HCl concentré (2N) + 0,5 g de Mg magnésium métallique.	Coloration rouge, orangée	Lee et al., (2006) .
Polyphénols	2 ml de chaque extrait + 0.2ml FeCl ₃ (solution alcoolique de chlorure ferrique) à Concentration 2% a été rajoutée.	Coloration bleu-noirâtre .	N'Guessan et al., (2009) .
Tanins	FeCl ₃ préparé à 1 % + 2 ml de chaque extrait.	Coloration bleu noir	Dohou et al., 2003].
Terpenoïdes	0,5 g d'extrait + 2 ml de chloroforme + 3 ml d'acide sulfurique (H ₂ SO ₄).	Couleur brune rougeâtre à la surface	Ayoola et al., (2008) .
Alcaloïdes	Test de Dragendorff : 3 ml de l'extrait + 5ml de HCL (1%), une incubation dans un bain marie. Enfin addition de 0,2 ml de réactif de Dragendoff.	Formation d'un précipité blanc	Evans, 2002 .

I.1.5. Séparation des produits d' *H.albus*

I.1.5.1. Préparation des phases

Nous avons solubilisé 5g de l'extrait HAMEOH dans 15ml d'eau distillée plus 15 ml de butanol pour intensifier la solubilité.

La séparation est faite en utilisant une ampoule à décanter et nous avons obtenu deux phases : (phase aqueuse et phase butanolique) puis ces phases ont été évaporées par l'intermédiaire d'un évaporateur rotatif a une vitesse de 60t/min a 37C puis pesés à la fin.

I.1.5.2. La colonne de séphadex

En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire (un adsorbant solide) est placée dans une colonne de verre verticale et la phase mobile (un liquide) est ajoutée au sommet et s'écoule à travers la colonne (par gravité ou par pression externe). La Chromatographie sur colonne est généralement utilisée comme technique de purification pour isoler les composés désirés d'un mélange [Kenkel, 2003].

Le gel de silice (SiO₂) et l'alumine (Al₂O₃) sont les deux adsorbants couramment utilisés pour la chromatographie sur colonne. Ces adsorbants sont vendus dans différentes tailles de mailles, indiquées par un numéro sur l'étiquette de la bouteille. La polarité du solvant qui traverse la colonne influe sur les vitesses relatives de déplacement des composés dans la colonne [Harvey, 2000].

Nous avons solubilisé 5 g de la phase butanolique sur une colonne de gel de séphadexTM LH-20 (GE Healthcare). Le gel été préparé par la solubilisation de 100 g de la poudre de Séphadex dans le méthanol pur pour 120 minutes et le transferer dans la colonne, le débit est réglé a (2ml/min). Les fractions obtenues ont été collectés par un collecteur automatique [Harvey,2000].

I.1.5.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie CCM est utilisée pour fusionner les fractions semblables issus de la colonne de séphadex sur une plaque de CCM sans contamination de leurs purtés [Kenkel, 2003]. Les plaques utilisées sont en verre de silicagel type 60 F254 (Merk, USA), qui sont composés par deux systèmes de

migration : chloroforme-méthanol-eau (80 :18 :02), Butanol-Acid acétique-eau (60 :15 :25) [Diallo *et al.*, 2004].

I.1.6. Caractérisation et identification des molécules

I.1.6.1. Purification des fractions par HPLC préparative

La chromatographie en phase liquide à haute performance est essentiellement utilisée à la base d'une colonne chromatographique améliorée, au lieu de laisser le solvant sera absorber dans la colonne par l'effet de gravité, il est forcé sous une grande pression qui obtiendra 400 atmosphères ce qui l'oblige à ce déplacer rapidement, cette technique nous permettra d'utiliser des particules de très petite taille pour le conditionnement de la colonne ce qui lui donne une grande surface d'interaction entre la phase stationnaire et la fluidité des molécules à travers celle-là, cela assure une meilleure séparation des molécules de l'extrait [Harvey,2000].

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est la méthode convenable pour la purification et la séparation des produits naturels.

Les différentes fractions obtenues à partir de la CCM ont été purifiées avec une HPLC préparative type LC-20 marques (Shimadzu made in Irlande), détecteur RID-10 AA (débit 2ml/min) et une colonne (phase inverse C18 Bondapack part : wat 0844176, 10µm 125 °C, Serial N° :02043822813005.

Deux principales fractions ont été mises pour purification suite à leurs activités anticancéreuses intéressantes déjà testé dans la présente étude en utilisant le même instrument et la précédente colonne.

Ces deux fractions ont été solubilisées dans 90% d'eau et 10% d'acétonitrile avec lancement de méthode de purification (10-60% dans 20 minutes). Par la suite nous avons collecté les produits purs qui se séparent en forme de pique affichés au moniteur.

I.1.6.3. Analyse des molécules par HPLC analytique

Le principe de cette technique est celle de l'HPLC préparative dont la seule différence est la méthode d'injection. Les molécules obtenues ont été analysées par HPLC analytique (Shimadzu SérieI No : L524050 C18 Phenomenex : Kinetx 5µm, L150*D4, 6mm. 100A ; made in USA) pour analyser la pureté des molécules selon les profils affichés au moniteur.

Pour chaque échantillon, nous avons fait une injection de 15µl, avec enregistrement des chromatogrammes et de spectres (200-600 nm).

I.1.6.4. Analyse par LC-MASS Spectrométrie

La spectrométrie de masse nous permet de déterminer la masse et la formule moléculaire d'une molécule, ainsi que certaines caractéristiques. Une petite quantité d'échantillon a été évaporée et ionisée comme un résultat de suppression d'un électron de chaque molécule en produisant un cation. Les chaînes qui se séparent sont les plus fragiles et qui résultent la formation des produits plus stables. Ces fragments des molécules sont détectés séparément sur la base du rapport masse-charge [Henry, 1989].

Les détails de comment ces fragments chargés positivement sont séparés et détectés se diffère selon un désigne de masse analyseur de l'instrument. L'information obtenue sera affichée par un système soft (spectrométrie) ce qui nous permet de faire la reconstitution de la molécule originale et l'identifier [Kenkel, 2003].

Nous avons injecté les produits purs obtenus par HPLC préparative et déjà vérifiés par HPLC analytique dans l'instrument LC-MASS (Agilent Technologies LC Mass 6110, C18. T= 25C) pour identifier leurs poids moléculaires.

I.1.6.5. Solidification des produits

Ce protocole est utilisé dans le but de changer l'état de la matière des produits purs de liquide en solide (poudre) et d'évaporer tout les solvants inclus dans nos produits (eau et acétonitrile) en utilisant un rota-vapeur et un lyophilisateur CRIOS-55 pour préparer les molécules à la caractérisation.

I.1.6.6. Résonance magnétique nucléaire (RMN) spectrométrie

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est basée sur le principe d'absorbance d'énergie quand un noyau d'un atome est excité de son spin à faible énergie au spin à forte énergie, plusieurs molécules sont difficiles à être étudiées par RMN, seul les molécules organiques qui ont des isotopes (^1H et ^{13}C) qui sont capables de refléter un spectre RMN qui est riche en information structurales.

La résonance magnétique nucléaire à proton (RMN^1H) nous explique l'environnement de différents atomes d'hydrogène dans une molécule ; la résonance magnétique à carbone (^{13}C RMN) dont le spectre agit pareil sur les atomes de carbones [Carey, 2000]. L'ensemble du ^1H et ^{13}C est utilisé dans le but de déterminer la nature des atomes présents, leurs nombres et leurs enchainements et ainsi de connaître la structure totale de nos molécules organiques.

Les produits purifiés obtenus après HPLC ont été bien évaporés avec l'évaporateur rotatif puis séchés avec le nitrogène et un lyophilisateur ; après nous avons solubilisé chaque produit dans 0.5 ml de méthanol Deuterium oxide et nous avons utilisé deux instruments (OXFORD , Varian 400 MHz) (Oxford, Varian 500MHz) [Campos *et al.*,2014].

I.1.6.7. Résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle (RMN 2D)

Pour certains molécules l'RMN à proton et à carbone est insuffisant pour l'identification de structure nouvelle ou inconnue, donc nous avons utilisé la résonance magnétique bidimensionnel (COSY, HSQC et HMBC) en utilisant l'instrument OXFORD, Varian 500 MHz qui se repose sur une succession de trois intervalles de temps : préparation, évolution et détection [Canet ,1991].

I.2. Etude de l'activité anticancéreuse *in vitro*

I.2.1. Culture Cellulaire

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées dans cette expérience. Il s'agit de : Cellules cancéreuse hormono-résistant de la prostate (DU-145 et PC3) , Lignée cancéreuse hormono-sensible de la prostate humaine (LNCap), Lignée cellulaire de glioblastomes immortalisées (U-87 MG, U-373 MG) ,Lignée astrocytaire tumorale (LN229), lignées tumoral osseuse (U-2 OS). Ces lignées ont été mises en culture dans le milieu DMEM (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA) (Dulbecco's modifications of Eugal's medium avec L-glutamine et 4.5g/L de glucose) (Loza ,Belgium) supplémenté avec 10% de sérum bovin foetale (FBS) (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 unités/ml de pénicilline G et 100 mg/ml de streptomycine (Lonza Group Ltd., Switzerland) (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA) à CO₂ de 5 % et 37°C pendant une semaine [Jin *et al.*,2010].

I.2.2. Test MTT des fractions : C, D, F, G

L'activité anticancéreuse des fractions obtenues du HAMEOH a été évaluée par le test MTT [(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5diphényltétrazolium bromide ; Sigma-Aldrich, Merck, Germany) illustré par [Mossmann, 1983; Skehan ,1990] .

Les lignées cellulaires DU-145 , PC3 , LNCAP , U-373 et U-87 MG ont été fournies par l'institut du cancer des Etas Unis d'Amérique NCI .

Les cellules ont été poussées dans le milieu (DMEM), constitué de 5% du sérum bovin fœtal (FBS), Pénicilline G (100 U/ml) la Streptomycine sulfate (100µg/ml) dans 35°C et 4,7% du CO₂ pour sept jours.

Une semaine après, les cellules ont été lavées avec des tampons de phosphate saline (PBS) et traitées par «trypsine EDTA » et incubées pendant 4 minutes à une température de 38°C et 4,7% de CO₂.

Après incubation, nous avons introduit le milieu de culture aux cellules dans des tubes coniques et les centrifugés pendant 10 à 40 minutes pour séparer les cellules du milieu.

Après trypsinisation, toutes les lignées cellulaires ont étéensemencées dans 100 µl du milieu dans une plaque à 96 puits. Un jour plus tard, les cellules ont été traitées avec les fractions C, D, F et G à une large gamme de concentration, de 1,6 µg / ml à 200 µg / ml, et avec du docétaxel (DTX) (concentration de 0,39 ng / ml à 50 ng / ml). Le même protocole a été utilisé pour le traitement avec du DMSO (diméthylsulfoxyde) qui est utilisé comme témoin.

Après 72 h d'incubation, les cellules ont été exposées à une solution de MTT préparée à 10% pendant 3-4 h à 37 ° C. Après la période d'incubation, la solution de MTT a été éliminée et les cristaux de formazan solubilisés avec une solution d'isopropanol / HCl (1N) pendant 20 minutes.

L'absorbance a été mesurée à 570 nm avec un lecteur de microplaques Bio-Rad en utilisant le logiciel Microplate Manager (Bio-Rad, Californie, USA) [Skehan ,1990]. La viabilité et la mortalité cellulaire ont été calculées par la méthode suivante :

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = (\text{Abs test} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

$$\% \text{ Mortalité} = 100 - \% \text{ Viabilité cellulaire} \text{ [Mossmann, 1983].}$$

Les valeurs de concentration inhibitrice demi-maximale (IC₅₀) ont été calculées comme les concentrations qui montrent 50% d'inhibition de la prolifération sur toute lignée cellulaire testée. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

I.2.3. Marquage de l'apoptose par l'acridine orange (AO)

L'acridine (C₃₄H₄₀Cl₄N₆Zn) est un colorant biologique vital qui se fixe sur les acides nucléiques, dans notre expérience nous avons suivi la méthode de **Lenga, (1993)**

Nous avons incubés 25 µl de la suspension cellulaire (de PC-3 et DU-145) avec 1µl de solution d'acridine (ThermoFisher A1301) pendant 10 à 20 minutes, nous avons testé la fraction C (200 µg/ml) et puis nous les avons visualisé juste après incubation

Nous avons palcé 10 µl de la suspension sur une lame microscopique couverte d'une lamelle puis nous avons examinés à l'aide d'un microscope à fluorescence (X60) mené d'un filtre à fluorescéine.

I.2.4. Test MTT des molécules FCP1, FCP2 , FCP3 , FFPh, FFP3

L'activité anticancéreuse des molécules obtenus du HAMEOH a été évaluée par le test MTT [-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, Merck, Germany) illustre par **Mossmann, 1983 et Skehan ,(1990)**. Les molécules des fractions C et F sont testées avec des concentrations allant de (7,8 µM à 1000 µM). Le même protocole de test des fractions a été appliqué selon la méthode de **Skehan ,(1990)**.

1.2.5. Analyse de l'apoptose par la cytométrie en flux

L'analyse de l'apoptose a été réalisée par cytométrie de flux (cytomètre en flux CytoFLEX, Beckman Coulter, Californie, USA). L'annexine V-FITC (isothiocyanate de fluorescéine) a été utilisée conjointement avec un colorant vital, l'iodure de propidium (PI), pour distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques.

Selon le protocole de **Rieger *et al.*, (2011)** , les cellules (2 ml) avec une densité de 10^4 ont été cultivées dans des boîtes de Pétri de 40 mm pour 24 h après les cellules ont été traitées avec les molécules purifiées de 200 µg / ml pendant 12, 24 et 48 h.

Après les différentes périodes de traitement, les cellules ont été récoltées et centrifugées à 335 tours pendant 10 min puis le surnageant a été lavé avec à PBS à 1% puis resuspendu avec l'annexine V et le tampon de liaison.

Les cellules lavées sont centrifugées puis le surnageant est rejeté. Les cellules obtenues sont mises en suspension avec 100 µl de tampon de liaison Annexin V et 5 µL Annexin V Alexa Fluor 488 a été ajouté puis faire incubé dans l'obscurité pendant 15min. 4 µL de PI (Propidium Iodide) dilué dans un tampon de liaison à l'annexine V (1: 10) a été ajouté puis incubé pendant 15min dans l'obscurité à température ambiante.

Le tampon de liaison Annexine V (500 μ l) a été ajouté pour laver les cellules colorées par l'annexine / PI. Cette dernière a été évaluée selon l'analyse des cellules apoptotiques qui a été réalisée par CytExpert Software pour CytoFLEX (Beckman Coulter, Californie, USA).

I.3. Etude statistique

Les analyses statistiques de nos résultats sont réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad prism 6.

L'analyse de la variance à un seul ou à deux facteurs (ANOVA I, ANOVA II) est utilisée pour comparer la différence entre les différents paramètres qualitatifs et quantitatifs étudiés. L'homogénéité de la variance entre ces paramètres est vérifiée par le test de Fisher et Bartlett. Dans le cas où ce test s'avère significatif ($P < 0.05$), la distribution est normalisée par une transformation adéquate (logarithmique, la racine de carré). Lorsque ce test est non significatif ($P > 0.05$), un post test du Tukey ou Bonferroni sont appliqués pour comparer les moyennes entre les paramètres.

Les résultats sont exprimés en (moyenne \pm SEM). Quand ($P < 0.05$), la différence statistique est considérée significative.

I.4. Structures chimiques

Les structures chimiques des molécules obtenues ont été réalisées par le logiciel CHEM Draw Professional 15.0. Mac Version

Chapitre II
RESULTATS ET
DISCUSSION

II.1. Etude phytochimique de *H.albus*

II.1.1. Extraction et calcul du rendement

Après extraction nous avons obtenu les extraits organiques de la plante *H.albus* (EEp, Echl et EMe) en utilisant des solvants à polarité croissante. Le rendement de chaque extrait par rapport au poids du broyat est représenté dans le tableau 01.

Tableau 01. Rendement de différents extraits (EEp, Echl et EMe) des feuilles de *H.albus*

Extraits	Quantité de l'extrait (g)	Quantité de poudre végétale(g)	Rendement (%) Par rapport au poids du broyat
EEp (<i>H.albus</i>)	17.5	1000	1.75
Echl (<i>H.albus</i>)	30	1000	3.0
EMe (<i>H.albus</i>)	110	1000	10.1

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les resultants sont exprimés en pourcentage.

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, nos résultats sont exprimés en pourcentage. D'après nos résultats, le meilleur rendement a été obtenu avec l'extrait méthanolique (10.1%) tandis que le plus faible est celui de l'EEp, soit 1.75 % puis l'Echl (3.0 %). Le rendement dépend beaucoup plus de la méthode d'extraction et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée [Dhanani *et al.*,2017].

II.1.2. Analyse qualitative des extraits d'*H.albus* (Test préliminaires)

Le screening phytochimique des extraits de *H.albus* indique la présence des polyphénols, les tanins galliques, les terpenoïdes et les flavonoïdes dans tous les extraits de *H.albus* et surtout une richesse en alcaloïdes dans tous les extraits.

Nous avons remarqué que les tanins catéchiques sont absents dans l'extrait EEp et présents dans l'extrait Echl et EMe de cette plante (Tableau 02).

Tableau 02. Tests chimiques des extraits (EEp, EChl et EMe) des feuilles de *H.albus*.

Plante	Extraits	Alcaloïdes	Terpenoïdes	Tanins gallique (hydrolysables)	Flavonoïdes	Polyphénols
<i>Hyoscyamus Albus</i>	EEp	++	++	-	++	+++
	EChl	++	++	-	++	+++
	EMe	++	++	++	+++	+++

++++ : Très abondant ; +++ : abondant ; ++ : moyen ; - : réaction louche.

II.1.3. Séparation sur chromatographie sur colonne et CCM

Le tableau 03 montre le poids des extraits ainsi que le poids des phases obtenues.

Tableau 03. Poids des extraits et des phases aqueuses et butanoliques de *H.albus*.

Extraits et phases	Poids (g)
Extrait HAMEOH	62.25
Phase butanolique de <i>H .albus</i>	8.50
Phase aqueuse d' <i>H .albus</i>	5.44

La phase butanolique et aqueuse de cette plante a été testée sur CCM et nous avons trouvé que la phase aqueuse contient des sucres (**Figure 17**).

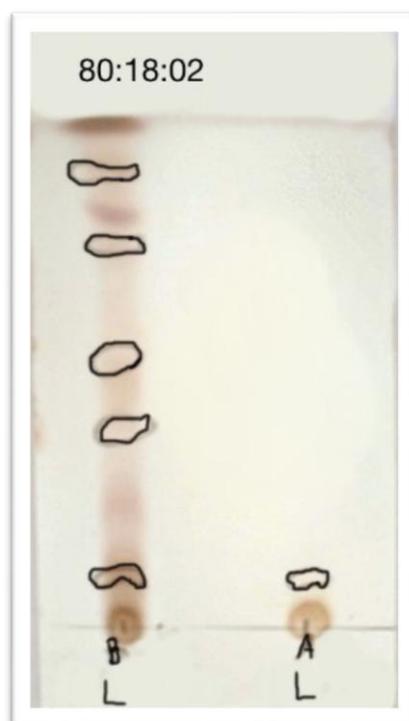


Figure 17 . Chromatogrammes des phases aqueuses et butanoliques de la plante *H.albus*.

Après l'analyse des résultats obtenus de CCM de *H.albus*, nous avons remarqué que les phases aqueuses n'ont pas pu migrer à cause de la présence des sucres donc nous allons travailler avec la phase butanolique.

La phase butanolique de *H.albus* a été mise en purification sur gel de Séphadex LH 20, après cette purification nous avons obtenus 40 fractions, ces dernières ont été analysées avec CCM, puis ont été réunis en 11 fractions séchées et pesées (Tableau 04).

Tableau 04. Fractions obtenues après séparation sur colonne de la phase butanolique de *H.albus*.

Fractions	Poids (mg)
F1	10 mg
F2	71 mg
F3	87 mg
F4	301 mg
F5	115 mg
F6	121 mg
F7	143 mg
F8	66 mg
F9	152 mg
F10	42 mg
F11	19 mg

Nous avons analysé ces 11 fractions sur CCM (Figure 18)

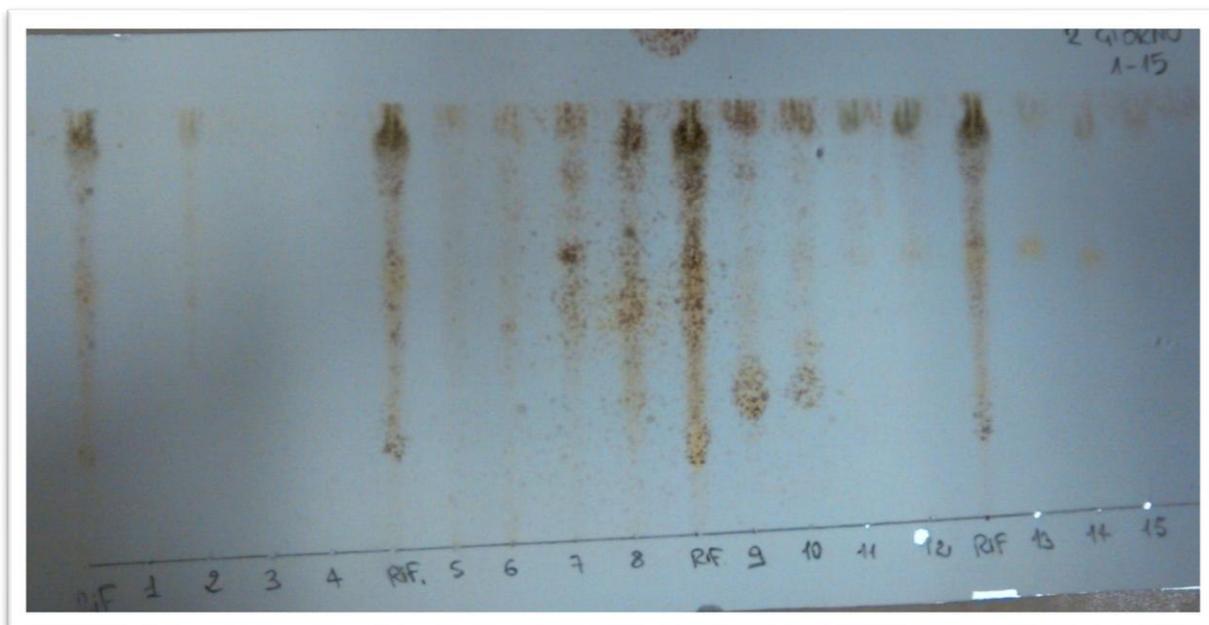


Figure 18. Chromatogramme de fractions obtenues de la phase butanolique de *H.albus* après purification sur colonne de Séphadex.

II.1.4. Analyse par HPLC préparative

Suite à l'activité cytotoxique évaluée sur quelques lignées cancéreuses, nous avons choisis de continuer avec les fractions F et C car ils ont donné les meilleurs résultats, nous les avons purifiés dans le but de caractériser les molécules responsables de cette activité.

La fraction F et C ont été purifiés sur HPLC en utilisant l'H₂O et l'acétonitrile (ACN).

Les pics sur le chromatogramme (**Figure 19 et 20**) représente des molécules qui ont été collectées séparément.

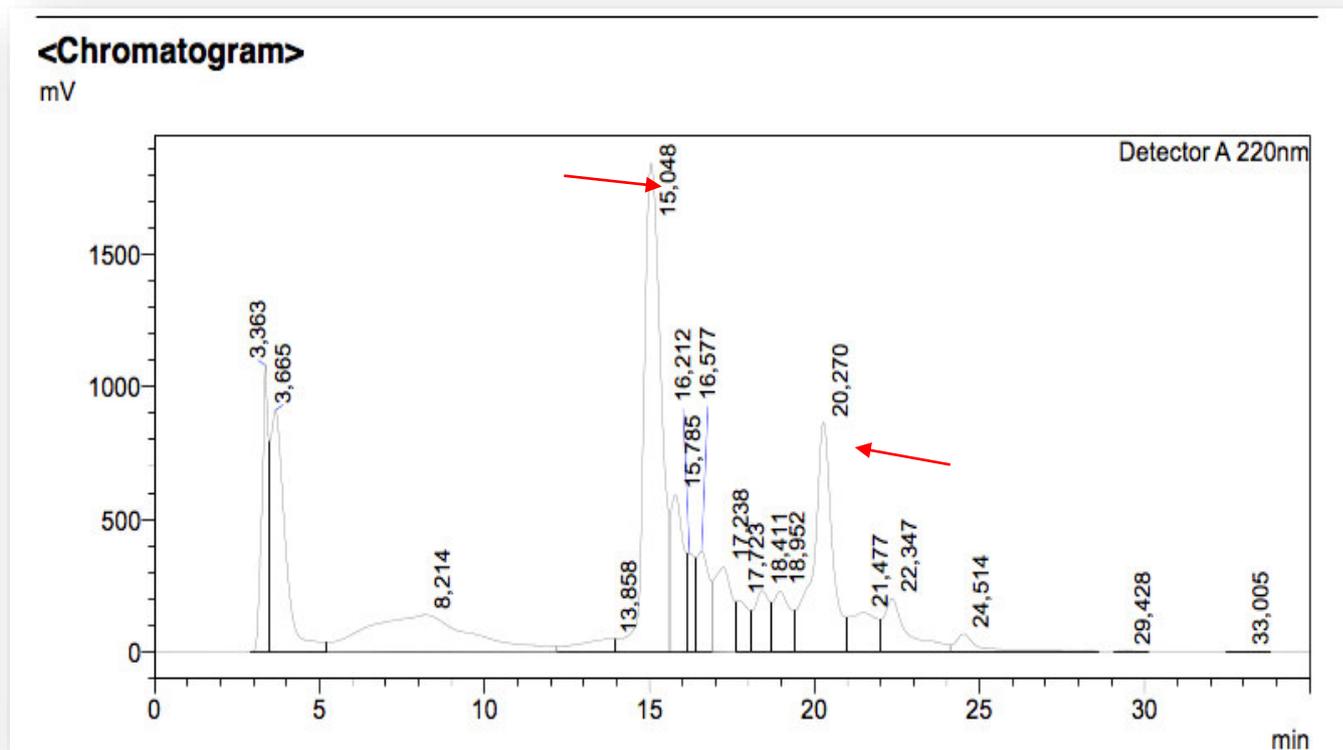


Figure 19. Chromatogramme de l'HPLC préparative de la Fraction F.

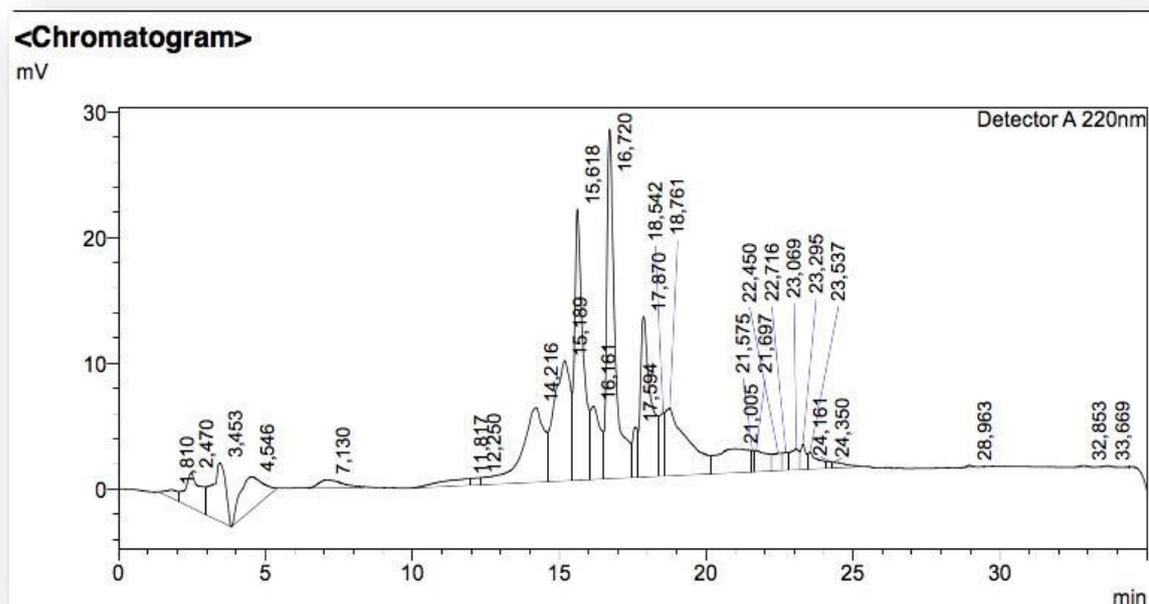
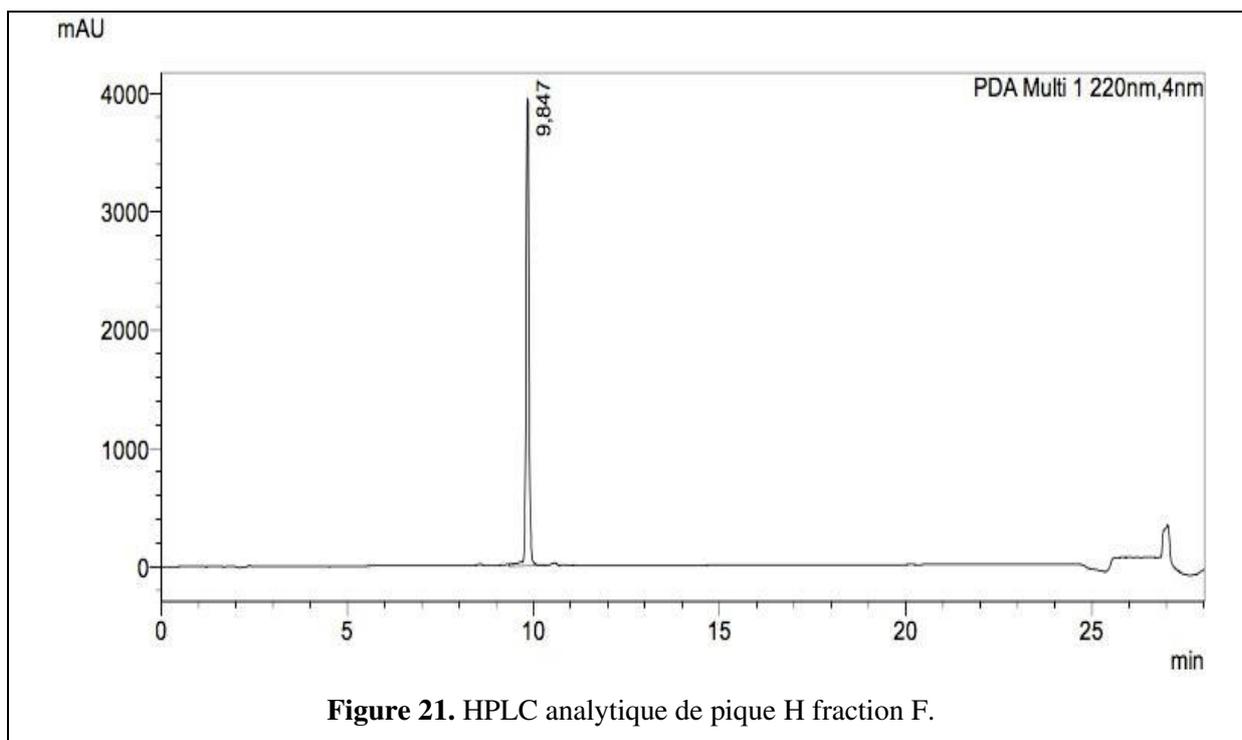


Figure 20. Chromatogramme de l'HPLC préparative de la Fraction C.

II.1.5. Analyse par HPLC Analytique

Nous avons collecté deux pics (FF pH et p3) majoritaires dont l'absorbance est plus élevée de la fraction F et trois pics de la fraction C (FC p1, p2, p3) et nous avons analysé leur pureté par HPLC analytique, les chromatogramme affichés dans les figure 21, 22, 23, 24.



Le chromatogramme indique la présence d'un seul pique pour chaque molécule ce qui signifie la pureté de la molécule collectée.

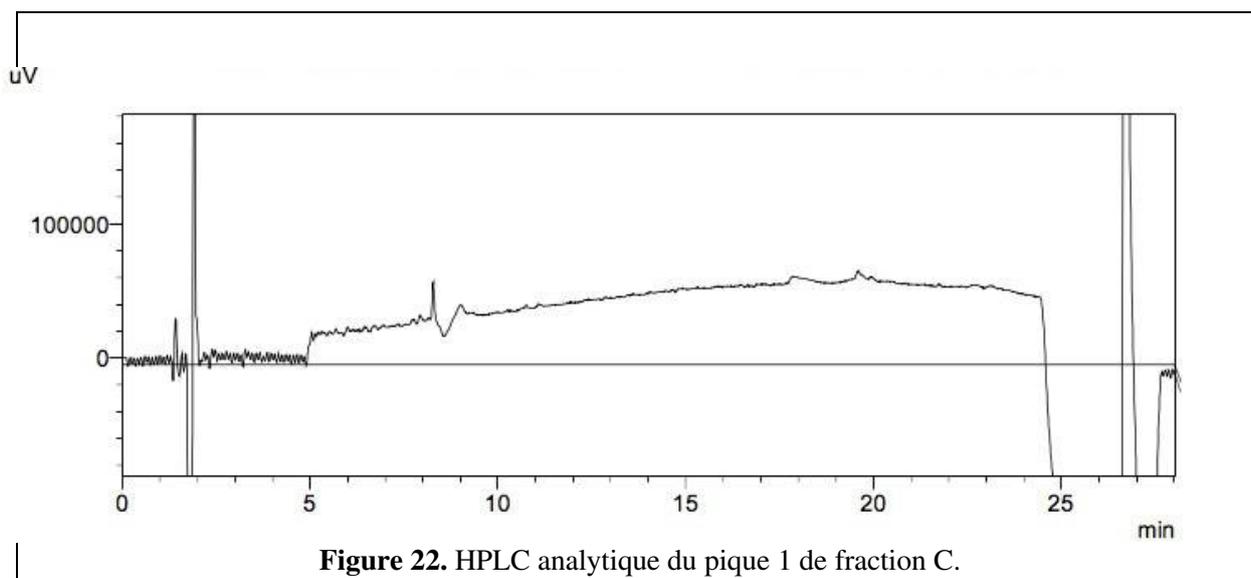
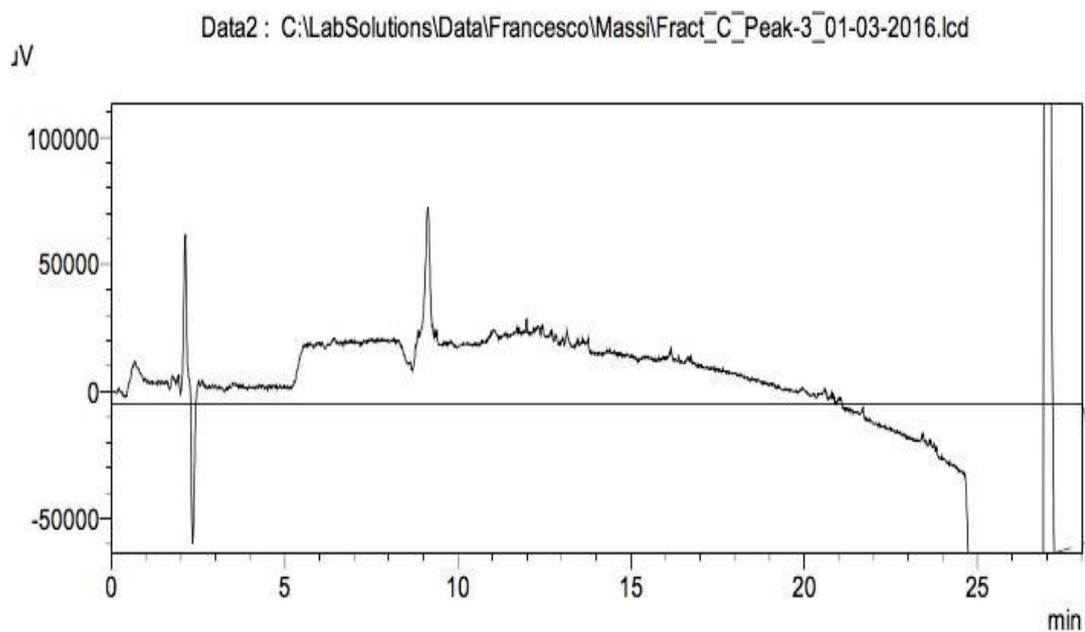
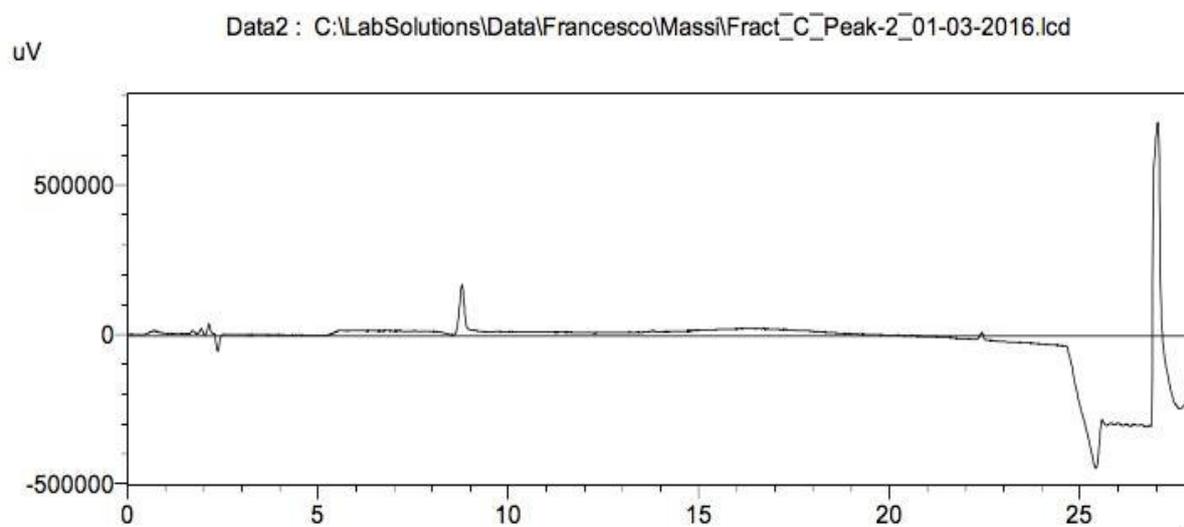


Figure 23.HPLC analytique du pique 2 de fraction C.**Figure24.**HPLC analytique du pique 3 fraction C.

II.1.6. Analyse par Spectrométrie de masse

Le poids moléculaire des molécules obtenues est classé dans le tableau 05 :

Tableau 05. Poids moléculaire des molécules obtenues .

Produits	Poids Moléculaires (g /mol)
FF-pH	649.2
FF-p3	336.1
FC-p1	472.3
FC-p2	291.1
FC-p3	210.1

Les figures 25, 26, 27, 28, 29 représente les spectres affichés sur la LC.MASS

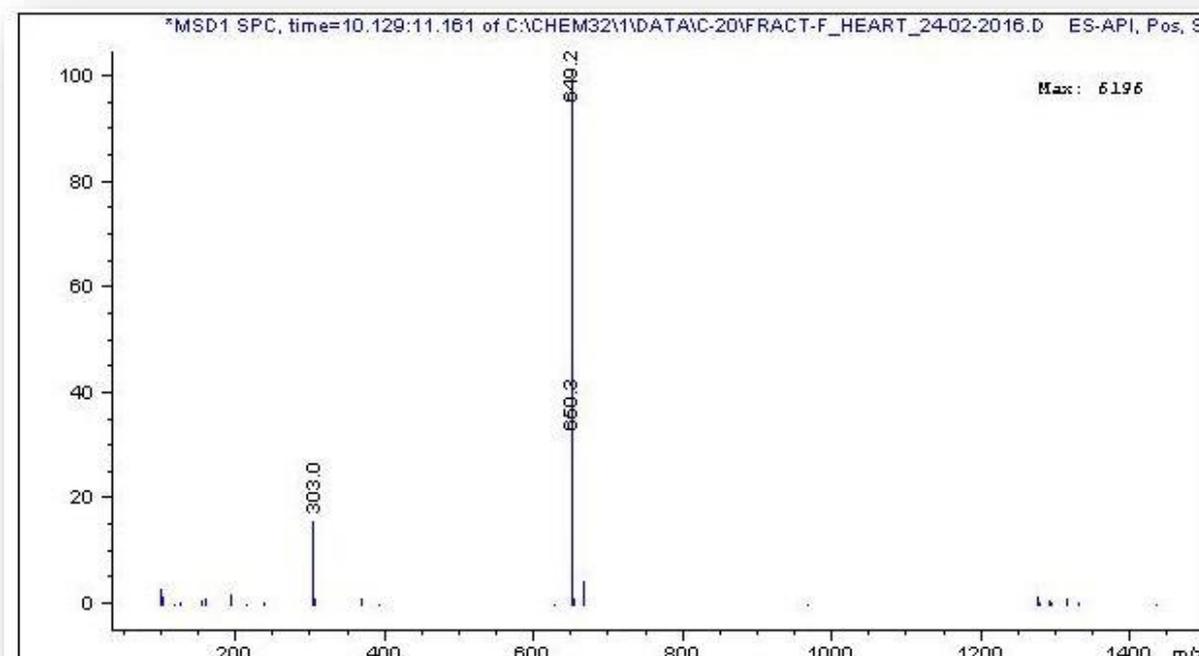


Figure 25. Spectre de Lc-mass Fraction F pique H (649.2)

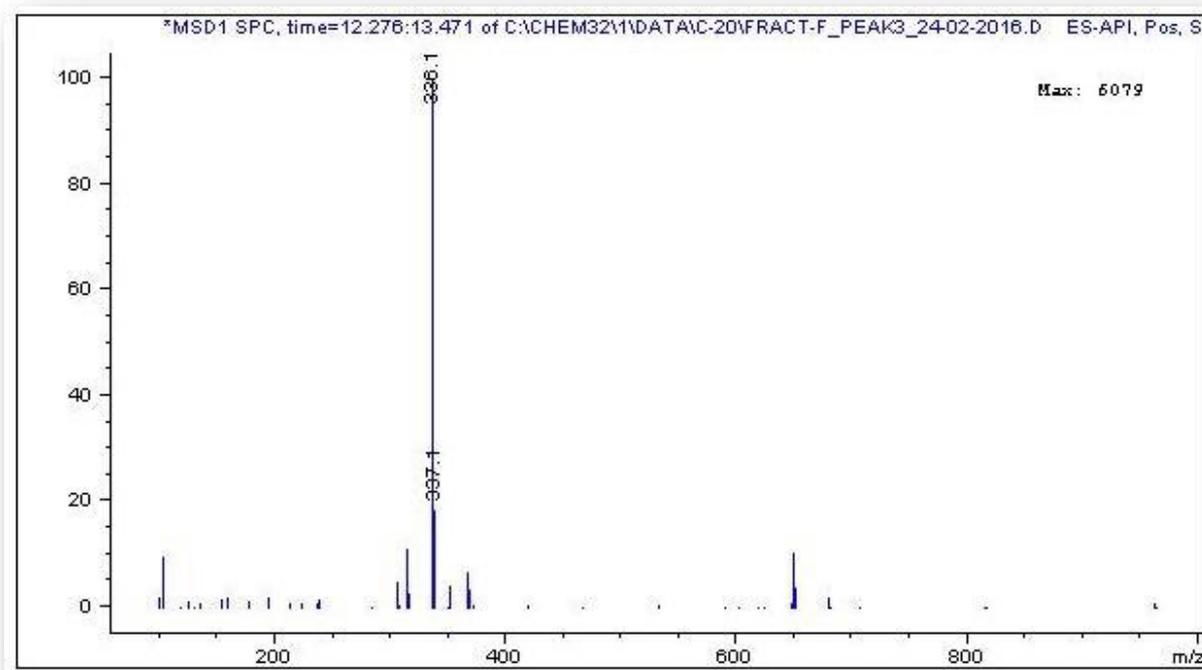


Figure 26. Spectre de Lc-mass Fraction F pique 3 (336.1 g/mol)

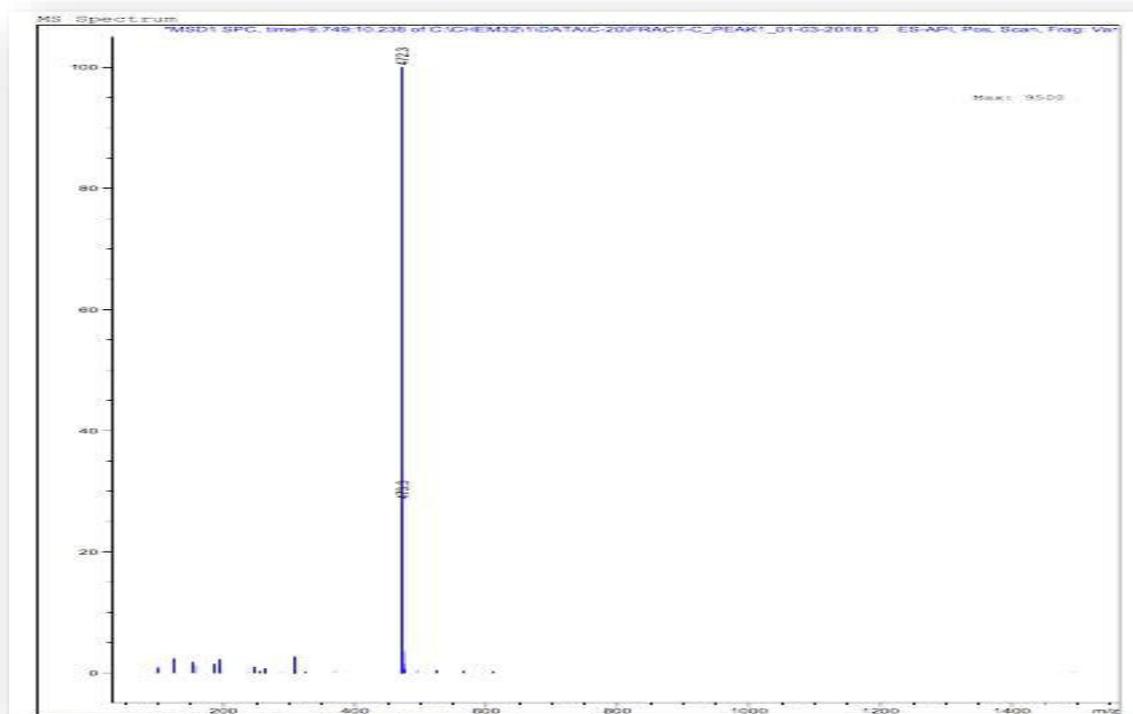


Figure 27. Spectre de Lc-mass Fraction C pique 1 (472.3)

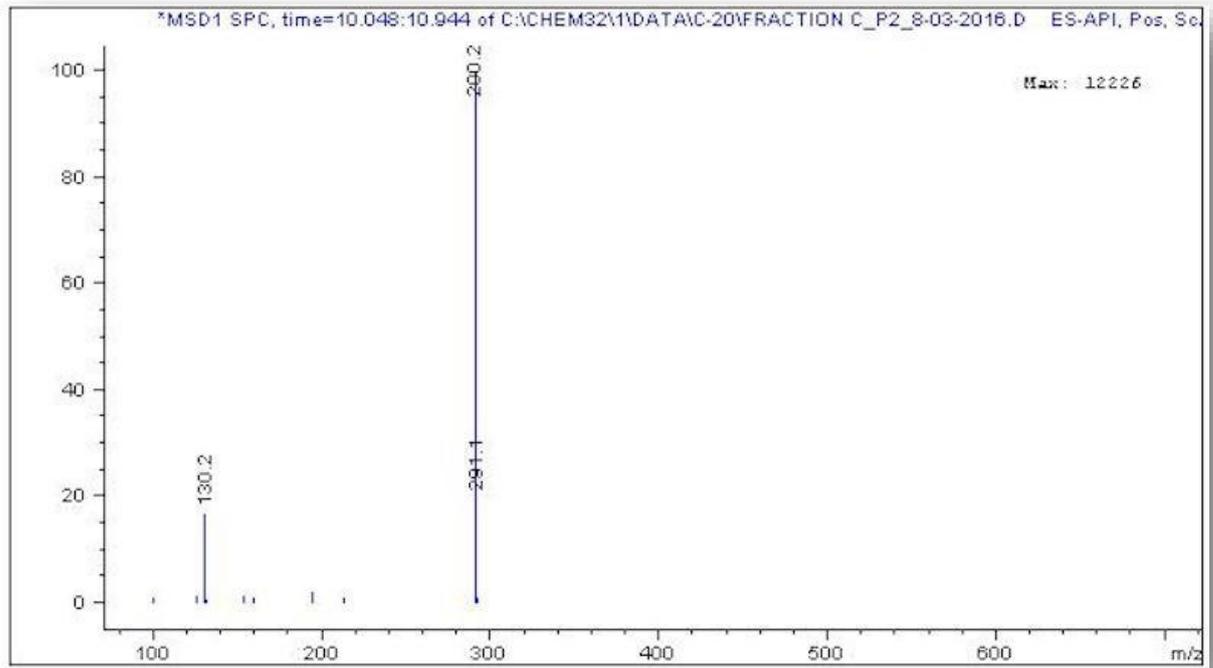


Figure 28. Spectre de Lc-mass Fraction C pique 2 (200.2)

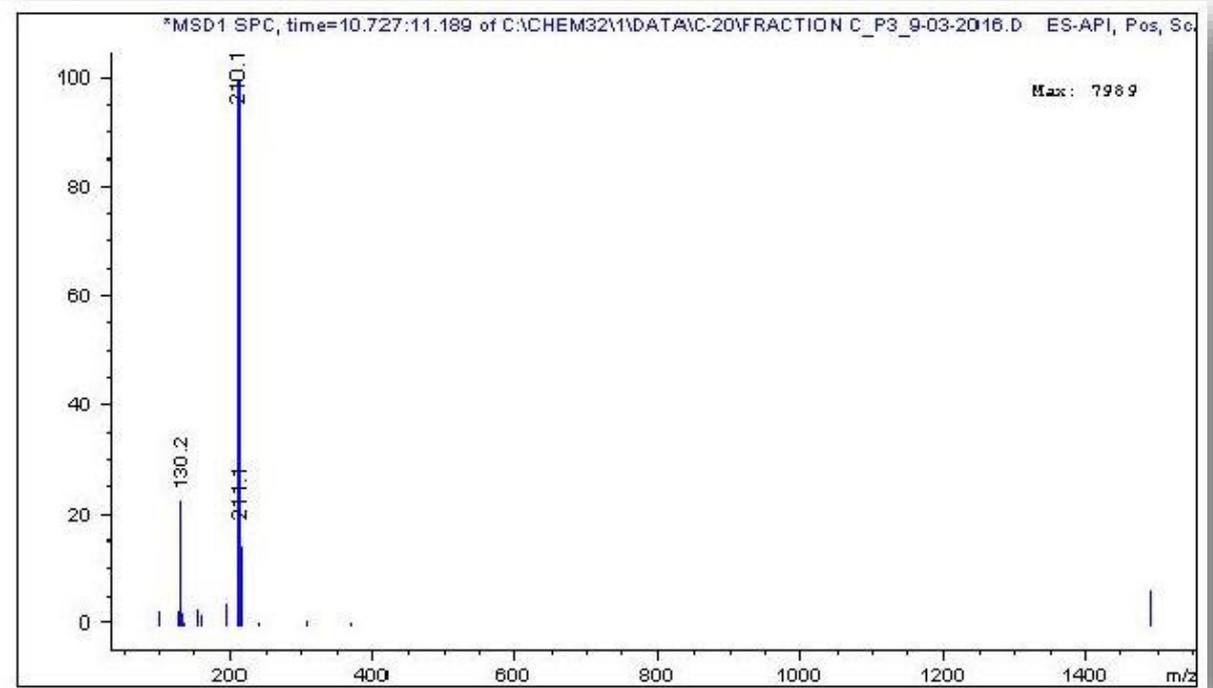


Figure 29. Spectre de Lc-mass Fraction C pique 3 (210.1)

II.1.7. Analyse par Spectrométrie RMN

II.1.7.1. Pique H Fraction F

L'analyse par RMN nous a permis de déterminer le nombre, l'enchaînement et la nature des atomes composant de chaque molécule (figures 30).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (^1H , d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.62 (^1H , dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.98 (^1H , d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.53 (^1H , d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.29 (^1H , d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.22 (^1H , d, $J = 8.4$ Hz, H-1''), 3.93 (^1H , d, $J = 7.2$ Hz, H-1''); EIMS m/z : 649 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$: 626) (Figure 31).

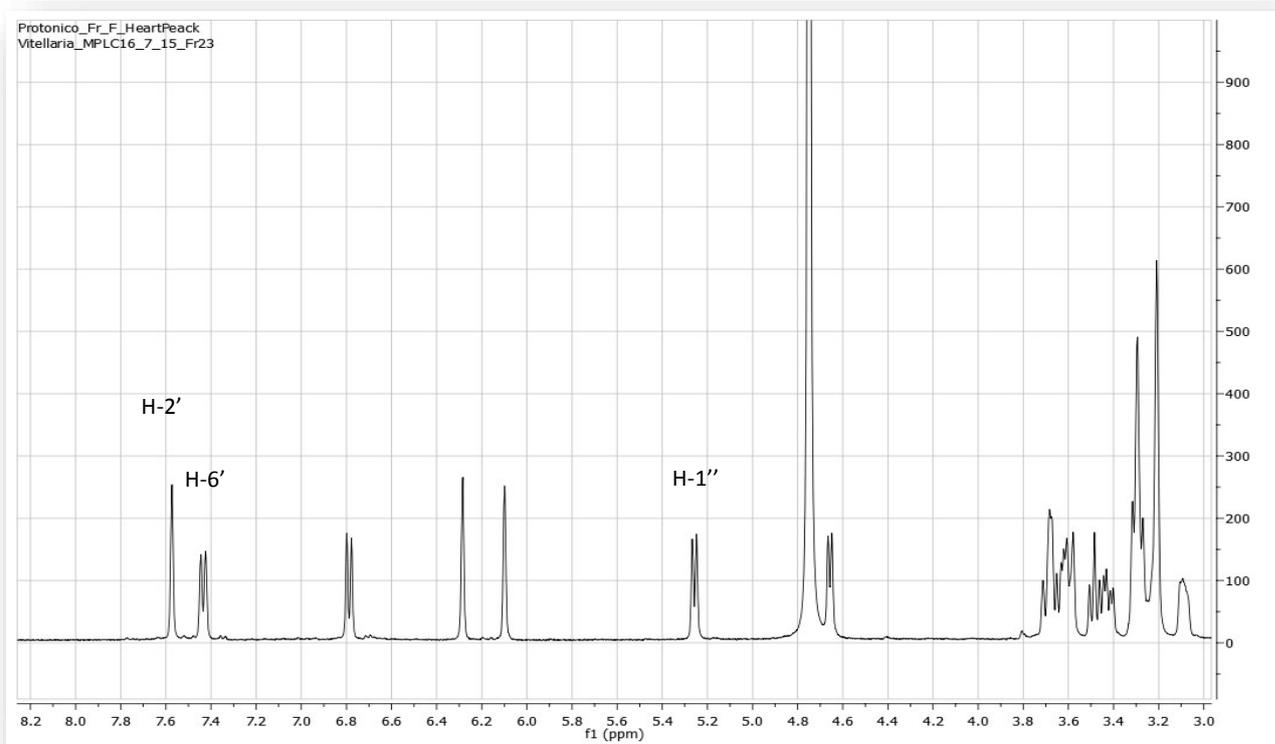


Figure 30. Spectre RMN ^1H de pique H fraction F.

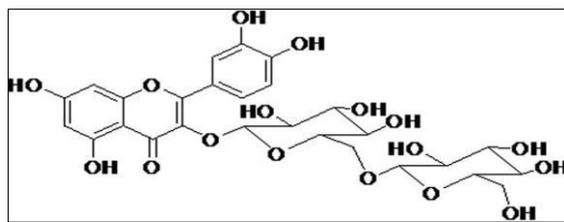


Figure 31. Structure chimique de la molécule (Ph-FF) Quercetin-3 -D-glucopyranosyl-(1 6)-B-D-glucopyranoside (QCGG).

La quercétine, un flavonoïde présent dans les fruits et les légumes, possède des propriétés biologiques uniques qui peuvent améliorer la performance mentale ou physique et réduire le risque d'infection [Davis *et al.*, 2009]. Ces propriétés constituent la base des bénéfices potentiels pour la santé globale et la résistance aux maladies, y compris les activités anti-cancérigènes, anti-inflammatoires, antivirales, antioxydantes et psychostimulantes, ainsi que la capacité à inhiber la peroxydation lipidique, l'agrégation plaquettaire et la perméabilité capillaire et aussi stimuler la biogenèse mitochondriale. Par conséquent, il existe un besoin pressant d'essais cliniques bien conçus pour évaluer davantage ce nouveau complément alimentaire [Aguirre *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2016].

La quercétine est classée comme un flavonol, l'une des six sous-classes de composés flavonoïdes. Le nom a été utilisé depuis 1857, et est dérivé de quercetum (forêt de chêne), après Quercus. C'est un inhibiteur naturel du transport de l'auxine polaire. La nomenclature de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) pour la quercétine est la 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflvanone (ou son synonyme 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxy-2-phénylchromène). 4-one). Cela signifie que la quercétine a un groupe OH fixé aux positions 3, 5, 7, 3' et 4' [Fischer *et al.*, 1997].

La quercétine (C₁₅H₁₀O₇) est un aglycone, sans sucre joint. C'est un cristal insoluble dans l'eau froide, peu soluble dans l'eau chaude, mais assez soluble dans l'alcool et les lipides. Un glycoside de quercétine est formé en attachant un groupe glycosyle (un sucre tel que le glucose, le rhamnose ou le rutinose) en remplacement de l'un des groupes OH (communément en position 3) [Materska, 2008]. Le groupe glycosyle attaché peut modifier la solubilité, l'absorption et les effets *in vivo* [Liet *et al.*, 2016]. En règle générale, la présence d'un groupe glycosyle (quercétine glycoside) entraîne une augmentation de la solubilité dans l'eau par rapport à la quercétine aglycone [Hollman, 1999].

Un glycoside de quercétine est unique par le groupe glycosyle attaché. Généralement, le terme quercétine devrait être utilisé pour décrire l'aglycone seulement ; Cependant, le nom est parfois utilisé pour désigner des molécules de type quercétine, y compris ses glycosides dans la recherche et l'industrie des suppléments [Ross et Kasum ,2002].

II.1.7.2. Pique 3 Fraction F

Le spectre RMN indique la présence de quatre systemes de spines : un aromatique ABX system [δ 7.10 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) and 7.0 (1H, dd, $J = 2, 8.2$ Hz)] assigne a H-2, H-5 and H-6 respectivement ; un autre aromatique A2B2 system [δ 7.05 (2H, d, $J = 6.8$ Hz) and 6.72 (2H, d, $J = 7.2$ Hz)] assigne aux protons H-2', H-6' and H-3', H-5' respectivement; une double liaison transd'un system AB [δ 7.43 (1H, d, $J = 15.6$ Hz) and 6.40 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)] assigne a H-7 and H-8 respectivement, et a AB system [δ 2.75 (2H, dd, $J = 7.1, 7.5$ Hz) et 3.46 (2H, dd, $J = 7.2, 6.5$ Hz)] assigne a H-7' and H-8' respectivement. Dans l'expérience HMBC , H-7 (δ 7.43) corrélé dans deux et trois chaines avec cinq signales de carbone a δ 128.39, 111.6, 123.33, 118.8 et 169.28 qui sont assigne sur C-1, C-2, C-6, C-8 et C-9 respectivement qui indique la présence de trans-feruloyl-group (figure 32 et 33).

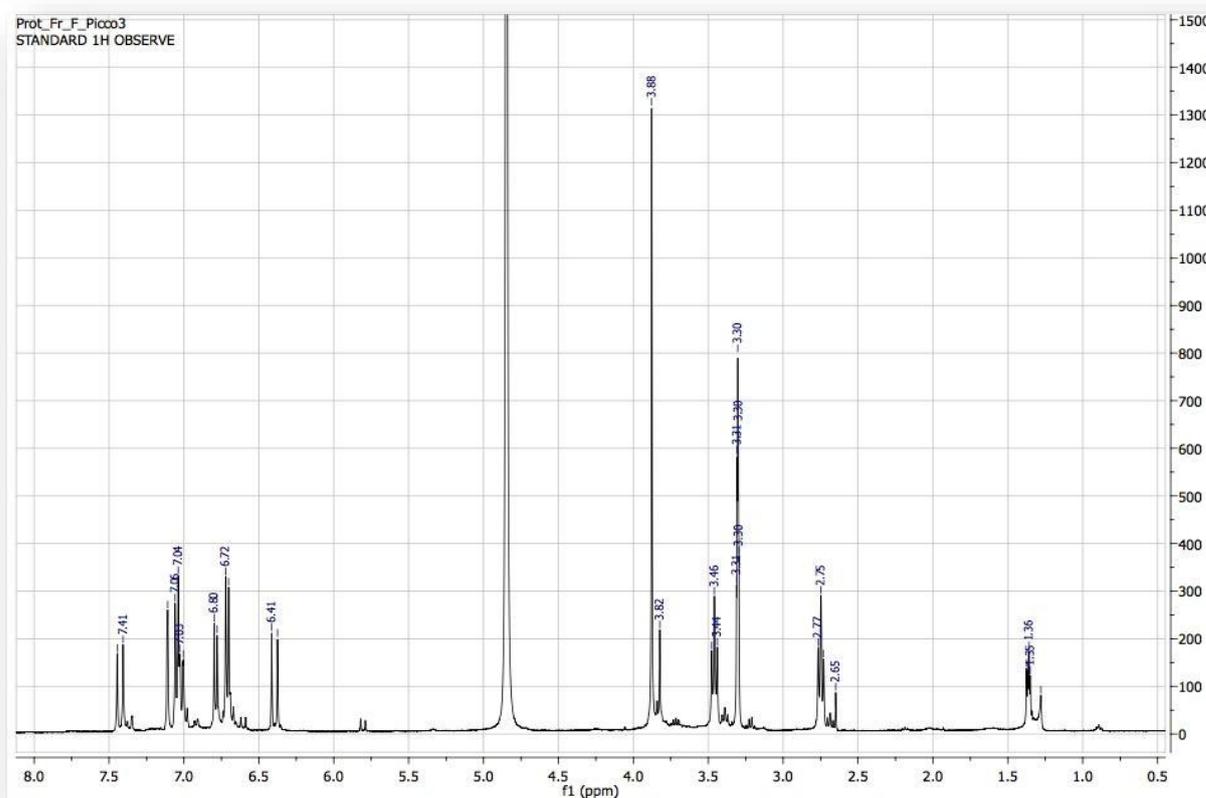


Figure 32. Spectre RMN H¹ du Pique 3 fraction F.

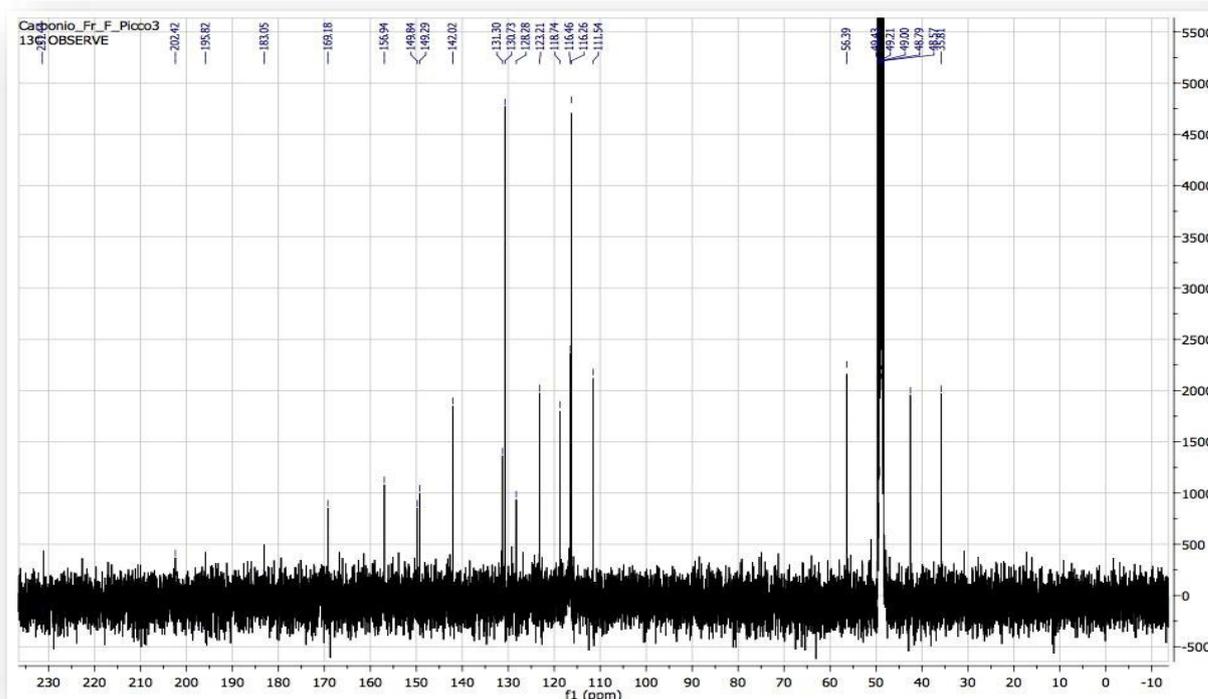


Figure 33. Spectre RMN C^{13} du pique 3 fraction F.

La spectrométrie de masse de la molécule $C_{18}H_{19}NO_4$ de m/z 336 $[M + Na]^+$, 192 $[M\text{-ethylbenzene}]$, 177 $[M\text{-ethylaminobenzene}]$. Cette molécule a été déjà reportée dans la littérature pour *Smilax aristolochiifolia* (Figure 34) [Amaro *et al.*, 2014].

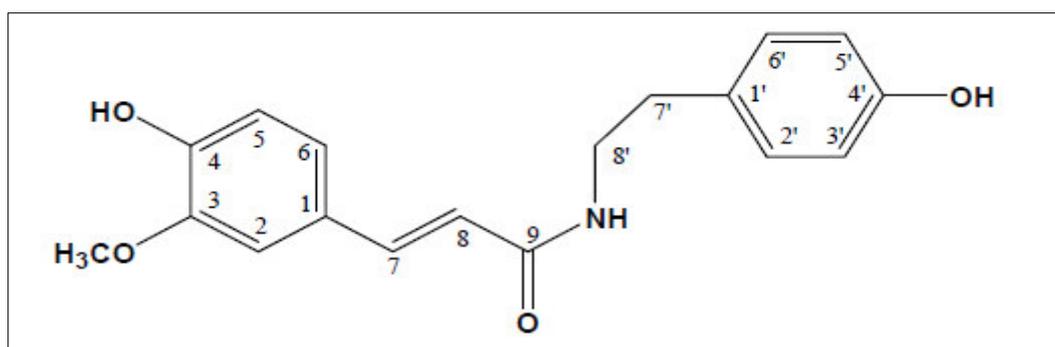


Figure 34. Structure chimique de la N-trans-Feruloyltyramine (FF-P3).

Les phénolamides ont souvent été décrits comme des composés bioactifs avec des activités thérapeutiques antiviral, antifongique, antibactérien, insecticide [Bassard *et al.*, 2010]. Par exemple, la N-feruloyltyramine a été isolée comme le composant d'ail le plus actif,

supprimant l'expression de la P-sélectine [Park, 2009a]. Donc il joue un rôle majeur positif sur le système cardiovasculaire par l'inhibition d'activation plaquettaire [Park, 2009 b].

N-trans-feruloyltyramine a été également décrit qu'il possède un effet antitumoral [Park et Schoene, 2002], antimycobactérien [Mata *et al.*, 2004], en tant qu'inhibiteur de la mélanogénèse dans une cellule de mélanome de souris [Efdi *et al.*, 2007] et inhibiteur de la cyclo-oxygénase [Park, 2007]. Ce conduit à des tentatives d'ingénierie de sa production à *E.coli* [Kang *et al.*, 2009] et le riz [Park *et al.*, 2009].

Autres amides phénoliques isolés de l'écorce de racine de *L. chinense*, dihydro-N-caféoyltyramine, trans-N-caféoyloctopamine, cis et trans-N-caféoyltyramine ont montré des activités antifongiques contre *Candida albicans* [Bassard *et al.*, 2010] ou propriétés anti-inflammatoires via la suppression de l'expression de la cycloxygénase [Han *et al.*, 2010].

Dans une étude faite par Efdi *et al.*, (2007), ont trouvés que la N-trans-feruloyltyramine a un effet sur la mélanogénèse dans des cellules de mélanome de souris B16. La mélanogénèse a été inhibée par la N-trans-feruloyltyramine d'une manière dépendante de la dose. La la N-trans-feruloyltyramine présentait une plus grande activité que l'acide kojique en tant qu'inhibiteur standard de la mélanogénèse. En outre, le traitement des cellules de mélanome B16 avec FA s'est avéré qu'elle provoque une diminution des niveaux d'expression de la tyrosinase. La régulation négative induite par la la N-trans-feruloyltyramine de la tyrosinase a entraîné la suppression de la biosynthèse de la mélanine dans les cellules de mélanome B16 murines.

La N-trans-feruloyltyramine a été rapporté dans les plantes et les cultures cellulaires des espèces de *Solanum*. Cet alkamide a également été associé à la paroi des cellules de certaines espèces de Solanacées et semble jouer un rôle important dans la défense de la plante [Keller *et al.*, 1996; Muhlenbeck *et al.*, 1996; Negrel *et al.*, 1996]. L'isolement de ces substances corroborent la classification de cette espèces du genre *Solanum* [Turnock *et al.*, 2001; Syu *et al.*, 2001].

Une étude phytochimique des feuilles de *Solanum sordidum* Sendtn., *Solanaceae*, a conduit à l'isolement de flavonoïdes rutine et 3-O-rhamnopyranosyl- (1 → 6) - β -glycopyranosyl kaempférol, de l'alcaloïde N-transféruloyltyraminede et des stéroïdes sitostérol et le stigmastérol [Goulart *et al.*, 1993 ; Alam *et al.*, 1996].

Thangnipon *et al.*,(2013) a montré que la N-trans-feruloyltyramine extraite de *Polyalthia suberosa*, a des activités antioxydantes et anti-inflammatoires sur le stress oxydatif induit par l'Ab (25-35) et la neurotoxicité.

La N-transféruoyltyramine était le constituant actif qui est responsable des niveaux d'expression de NO synthase (iNOS) [Naomichi *et al.*, 1983 ; Yokozawa *et al.*, 2000, Yokozawa *et al.*, 2001].

Cavin *et al.*, (1998) ont isolé le N-formylannonain, N-formylnornuciférine, et le cis-feruloyltyramine, N- trans-feruloyltyramine, et le secoisolariciresinol de la *T.crispa*. qui sont des antioxydantset ont une activité antioxydante élevée que le hydroxytoluène butylé (BHT) mais la puissance de piégeage des radicaux libres de la N-cis-feruloyltyramine, de la N-transféruoyltyramine et la secoisolariciresinol était plus élevée que l'antioxydant synthétique BHT.

II.1.7.3. Pique 1 fraction C

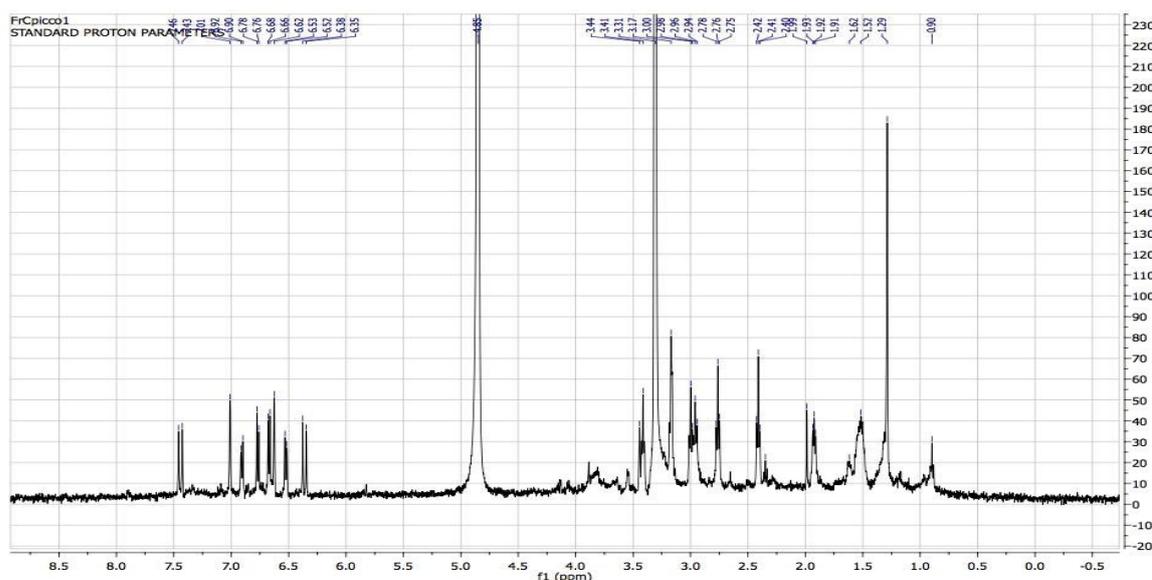


Figure 35. Spectre RMN H¹ du pique 1 fraction C.

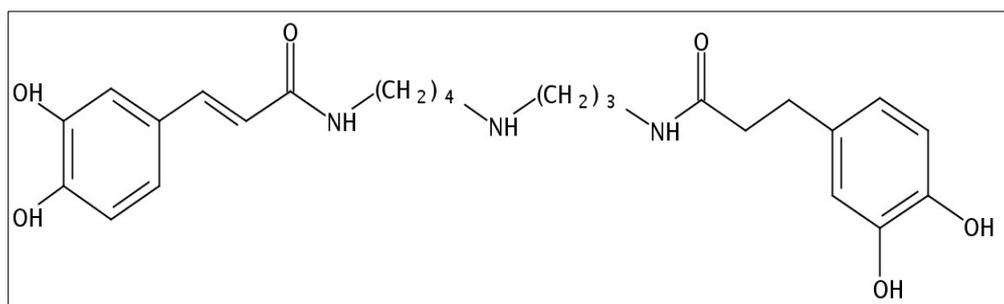


Figure 36. Structure Chimique de la N¹-(hydro)caffeoyl-N⁸-(hydro)caffeoylspermidine.

La structure du produit a été reconnu par une comparaison des profils figures : (35, 36) décrits dans la littérature de référence [Sun *et al.*, 2015].

Le nom «polyamines» désigne des composés organiques aliphatiques avec plus d'un groupe amine [Moschou *et al.*, 2008]. Putrescine, spermidine et la spermine sont les plus répandus dans tous les organismes vivants en particulier dans les tissus proliférant activement. Ils sont aussi les plus communs chez les plantes, alors que la cadavérine a également été signalée chez les légumineuses [Gill et Tuteja, 2010].

Des données récentes suggèrent que l'isomère spermine thermospermine pourrait être aussi répandu et était présent avant spermine dans les plantes [Kakehi *et al.*, 2008, Minguet *et al.*, 2008].

La spermidine est un précurseur de la désoxyhypusine, nécessaire pour la modification post-traductionnelle de facteur d'initiation de la traduction eIF5A des eucaryotes [Park, 2006] qui peut fournir une explication de l'exigence putrescine et le spermidine pour l'embryogenèse végétale. En outre, des mutants à un seul gène dans la biosynthèse de polyamine montrent généralement des phénotypes forts suggérant la diaphonie avec le contrôle phytohormone de développement des plantes [Kusano *et al.*, 2008].

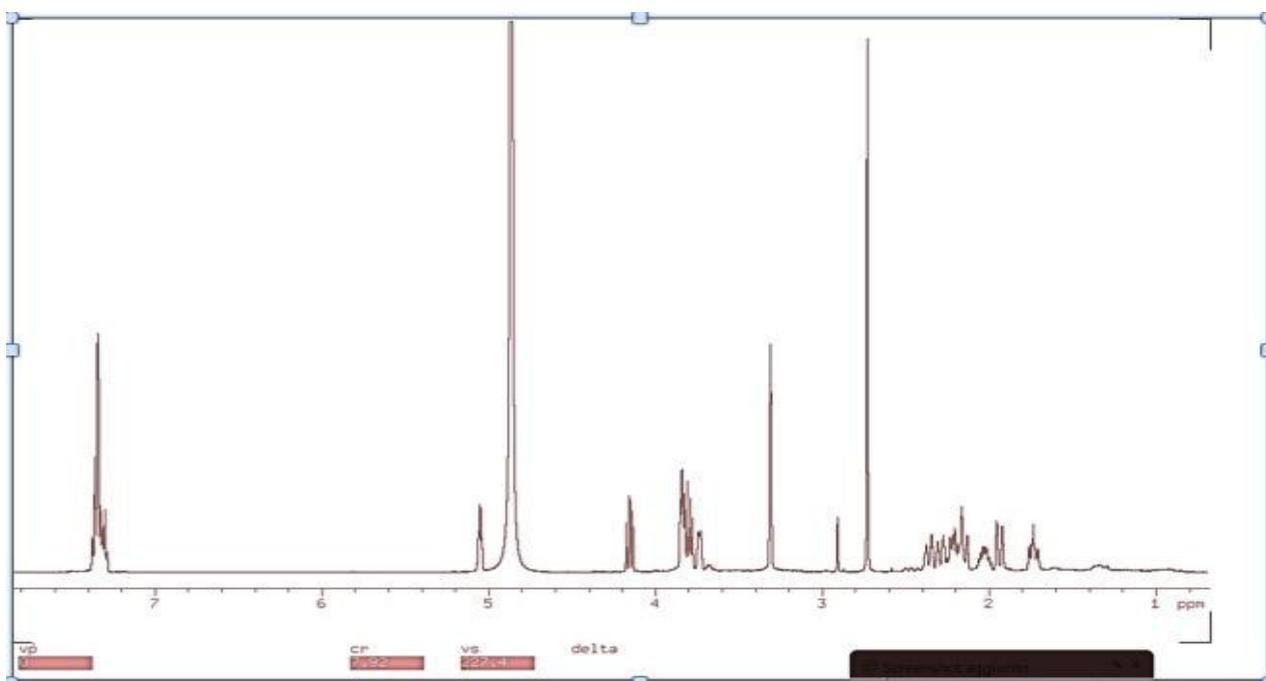


Figure 37. Spectre RMN H¹ du Pique 2 fraction C.

II.1.7.4. Pique2 fraction C

La structure a été reconnue par comparaison des profils figure 37 à la littérature qui montre qu'il s'agit de l'atropine [Madison Metabolomics Consortium - Francisca Jofre, Mark E. Anderson, John L. Markley, Ravi Rapolu].

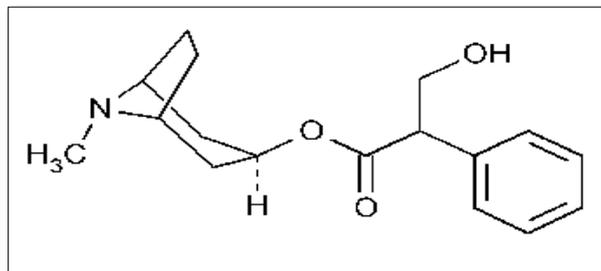


Figure 38 . Structure chimique de l'atropine (C₁₇H₂₃NO₃).

L'atropine est obtenue pour la première fois à partir de la feuille de la plante d'*Atropabelladonna* (*Solanaceae*), une plante très toxique et mortelle Linné l'a nommé après l'un des sorts, Atropus, qui a coupé le fil de la vie [Robert et Holzman ,1998 ; Choure et Neelam Vaidya, 2010].

Bien qu'il était populaire pour l'empoisonnement délibéré, il était évité en médecine, sauf pour un usage externe [Hollman ,1999].

Sir James Mackenzie (1853-1925) l'utilisait largement dans son travail d'arythmie. Il a montré que cela reviendrait bloc cardiaque partiel mais non complet [Stephenson *et al.*, 1834]. Les alcaloïdes de type tropane sont facilement séparés et détectés par CCM, mais cette technique n'est pas assez spécifique pour les fins médico-légales [Irenaet *al.*,2013].

La chromatographie en phase gazeuse reste l'une des techniques les plus couramment utilisées pour analyser ces alcaloïdes en fortes concentrations [Miraldi ,2001], mais elle est sujette à de nombreux problèmes tels que la décomposition ou la déshydratation sur colonne, qui ne peuvent être éliminées [Kaplan ,1974].

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse est couramment utilisée [Nogue et Pujol ,1995 ; Namera *et al.*, 2002 ; Philipov et Berkov, 2002], mais elle est également gênée par les problèmes rencontrés avec l'analyse GC et doit être dérivée avant l'analyse [Miraldi *et al.*, 2001]. Ces problèmes peuvent également aboutir à ne pas détecter les composants actifs d'une intoxication provoquée par l'ingestion de matériel végétal, ou peuvent entraîner une très faible récupération des composés toxiques suspectés [Byard *et al.*, 2002].

Une autre technique utile est la HPLC qui donne une bonne résolution en utilisant la chromatographie en phase inverse ou la chromatographie d'appariement d'ions [Sticht *et al.*, 1989 ; Oshima, 1989 ; Fliniaux, 1993 ; Bruneton, 1999].

Une méthode basée sur HPLC-MS-MS a été développée et appliquée. En raison de la nature instable de la scopolamine, l'atropine a été utilisée dans les études chromatographiques initiales. La valeur élevée de pKa (10,2) pour l'atropine pose quelques problèmes car la plupart des colonnes analytiques ne peuvent pas fonctionner à des pH supérieurs à neuf en raison de la dégradation de la structure de support en silice des colonnes analytiques à phase inversée [Bruneton, 1999].

Actuellement l'atropine, qui est un alcaloïde tropane extrait de la belladone mortelle (*Atropa belladonna*), jimsonweed (*Datura stramonium*), mandragore (*Mandragora officinarum*) et d'autres plantes de famille des solanacées [Litz *et al.*, 2006]. C'est un antagoniste compétitif des récepteurs cholinergiques muscariniques. Il est absorbé par le tractus gastro-intestinal et est excrété dans l'urine. C'est un métabolite secondaire des plantes et sert de médicament avec une grande variété d'effets. C'est un antagoniste compétitif pour le récepteur muscarinique de l'acétylcholine. Il est classé comme un médicament anticholinergique [Weinberg *et al.*, 2003].

Selon Choure et Vaidya , (2010), l'atropine subit un métabolisme hépatique et a une demi-vie plasmatique allant de 2-3 heures. Les ampoules d'atropine doivent être stockées à l'abri de la lumière et ne jamais être congelées.

L'atropine est présente chez de nombreux membres de la famille des solanacées. Le plus souvent est trouvé dans *Atropa belladonna*, *Datura inoxia*, *D. metel* et *D. stramonium*. D'autres sources comme le genre *Brugmansia* et *Hyoscyamus*.

Le genre *Nicotiana* (y compris la plante de tabac, *N. tabacum*) est également présente dans la famille des Solanacées, mais ces plantes ne contiennent de l'atropine ou d'autres alcaloïdes tropanes [Picard et Meek , 2006].

L'atropine est un mélange racémique de D-hyoscyamine et L-hyoscyamine, avec la plupart de ses effets physiologiques dus à la L-hyoscyamine. Ses effets pharmacologiques sont dus aux récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. C'est un agent antimuscarinique [Weinberg *et al.*, 1998].

L'atropine la plus fréquente composé utilisé en médecine est le sulfate d'atropine ($C_{17}H_{23}NO_3$)₂ · H₂SO₄ · H₂O, le nom chimique complet est le 1 α H, 5 α H-Tropan-3- α -ol (\pm)-tropate (ester), sulfate monohydraté [Weinberg *et al.*, 1998].

D'après Doerk-Schmitz *et al.*, (1993) le 3-propionyloxytropane, le 3-isobutyryloxytropane, le 3 β -tigloyloxynortropane et le 6-hydroxy-3-phényl-acétoxytropane sont décrits comme des composants de *H. albus* pour la première fois. Trois composés jusqu'ici inconnus ont été provisoirement identifiés comme N-méthylpyrrolidinyl-cuscohygrine, se présentant sous deux formes isomères, et comme 3 α -(p-hydroxyphényl) lactoyloxytropane (4'-hydroxylittorine). Comparées aux racines des plantes, les racines montrent un schéma alcaloïde similaire mais pas identique. La faible proportion de scopolamine dans les racines est particulièrement remarquable.

Doerek *et al.*, (1991) a identifiées quelques molécules à partir des racines d'*H. albus* qui sont l'hygrine, tropinone, tropine, pseudotropine, 3 α -acétoxytropane, 3 β -acétoxytropane, cuscohygrine, apoatropine, hyoscyamine, littorine, scopolamine, 6-hydroxylittorine.

II.2. Evaluation de l'activité anticancéreuse de la plante *H. albus*

II.2.1. Evaluation de l'activité cytotoxique des fractions

Le cancer est une maladie caractérisée par une croissance clonale des cellules somatiques par invasion et érosion, chaque voie qui est obligé de faire une réponse proliférative dans des cellules saines sera perturbée dans tous les cancers [Hanahan, 2000].

Le test MTT est l'une des méthodes les plus fréquentes pour l'étude de l'activité cytotoxique. Cette technique utilise un colorimètre pour déterminer la viabilité cellulaire [Mosmann *et al.*, 1983].

Dans le test MTT, une relation linéaire entre les cellules métaboliquement actives et la couleur produite est établie, permettant ainsi une quantification précises des changements dans le taux de mort ou de prolifération cellulaire [Van de Loosdrecht *et al.*, 1994].

MTT est une méthode appliquée pour l'évaluation de la viabilité cellulaire et de la cytotoxicité pour le criblage des médicaments. Ce test est basé sur la réduction de MTT (couleur jaune) et d'autres colorants de tétrazolium dépend des activités métaboliques cellulaires dues aux enzymes oxydoréductases NAD (P) H-dépendantes [Berridge *et al.*, 2005].

Les cellules saines et à croissance rapide présentent des taux élevés de réduction du MTT en formazan mais les cellules mortes ou inactives ne le font pas. Le produit final de la

réduction MTT est un formazan de couleur pourpre qui peut être facilement dissous dans le DMSO.

La viabilité du test MTT est liée à la quantification de formazan à 540 nm qui est linéairement associée à l'activité enzymatique et indirectement le nombre de cellules viables. L'intensité de la couleur pourpre élevée indique une viabilité cellulaire plus élevée tandis que la diminution de la couleur pourpre l'intensité signifie le nombre réduit de cellules et donc la cytotoxicité de la substance donnée [Bahuguna *et al.*,2017].

Nous avons d'abord effectué un test MTT afin d'explorer les effets de différents extraits isolés à partir de feuilles *H. albus* sur la viabilité cellulaire après 72 heures de traitement. Nous avons testé les extraits sur des cellules cancéreuses prostatiques humaines (DU-145, PC-3, LNCaP) et sur des lignées cellulaires de glioblastome humain (U-87 MG et U-373 MG) à une large gamme de concentration de (200 µg / ml à 1,6 mg / ml) et nous avons identifié la concentration inhibant les 50% de croissance cellulaire (IC50).

L'extrait C était plus actif que les autres extraits induisant les 50% d'inhibition de la croissance dans presque toutes les lignées cellulaires testées. En fait, nous avons observé que l'extrait C présentait une IC50 égale à 73 µg/mL sur DU-145, 187 µg / mL sur PC-3, 96 µg / ml sur U-87 MG et 114 µg / ml sur U-373 MG qui étaient significativement ($P \leq 0.0001$) plus faible que celle induite par les autres extraits.

Bien que l'extrait G produit une inhibition de la prolifération sur les cellules DU-145, LNCaP et U-373 MG, il montre une augmentation significative ($P > 0.0001$) de l'IC50 par rapport à l'extrait C. L'extrait F est plus actif sur les cellules cancéreuses prostatiques (DU-145 et PC-3), alors que l'extrait D a un effet inhibiteur uniquement sur le DU-145 (Tableau 06 et figure 39).

Tableau 06. Effet cytotoxique des fractions C, D, F, G de HAMEOH sur les cinq lignées cellulaires cancéreuses.

Lignées cellulaires	Extrait C (3) IC50 (µg /ml)	Extrait D (4) IC50 (µg /ml)	Extrait F (5) IC50 (µg /ml)	Extrait G (6) IC50(µg/ml)
DU-145	73±2.12	186±6.23	165±4.56	110±1.23
PC-3	187±5.23	-----	198±6.55	-----
LNCaP	-----	-----	-----	142±0.78
U-87 MG	96±2.50	-----	-----	-----
U-373 MG	114±3.12	-----	-----	133±9.32

Les valeurs sont la moyenne de trois expériences ± s.d.

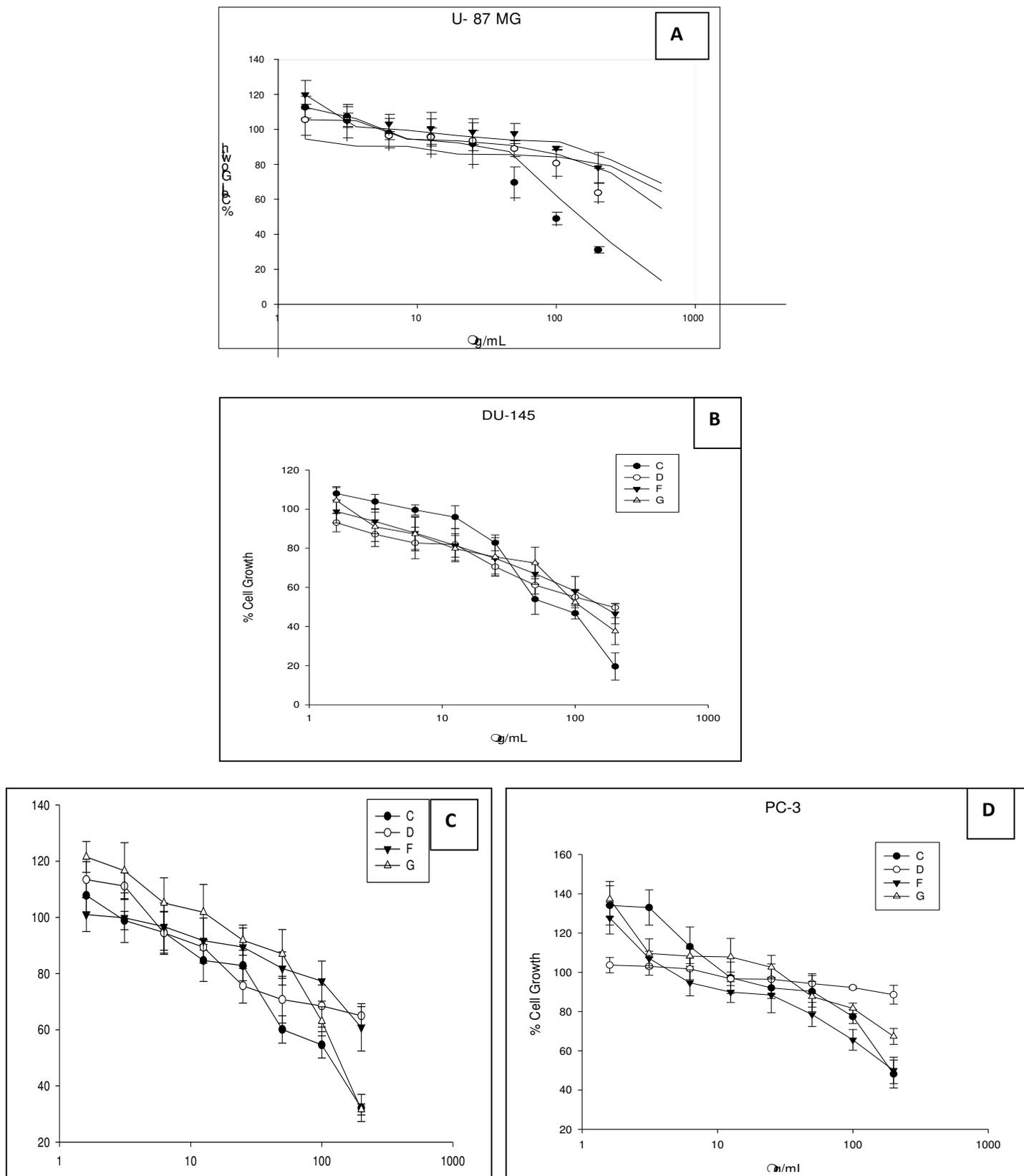


Figure 39. Graphes a , b , c et d montrant l'effet cytotoxique des fractions C,D,F et G sur les lignées DU-145 , PC-3,LNCaP,U-87MG et U-373 MG respectivement après 72 h de traitement. Les graphes sont en moyenne \pm SD de trois expériences en utilisant Graph pad prism 6.

Fang et al., (2010), ont trouvé que les flavonoïdes sont les meilleurs candidats pour un effet protecteur contre différents types de cancer. En effet, dans une autre étude, **Fukai et al., (2000)** ont évalué la cytotoxicité de plus de 100 polyphénols de bas poids moléculaire sur des lignées cellulaires normales et tumorales, ils ont montré que ces composés sont plus actifs sur les souches de cancer plutôt que ceux qui sont en bonne santé.

D'après **Fukai et al., (2002)** les flavonoïdes agissent à différents niveaux de processus de cancérogenèse : ils réduisent l'activation des procarcinogènes à cancérogènes en interagissant avec les cytochromes P450, ou par l'induction de la synthèse de certains cytochromes (CYP1A1 et CYP1A2, CYP1B1), soit en étant métabolisé par certains cytochromes, ou en modulant les activités enzymatiques de certains (stimulation ou inhibition). Il a été constaté que les cytochromes CYP1A1 et CYP1B1 sont surexprimés dans les tissus tumoraux et métabolisent les procarcinogènes en cancérogènes [**Androutsopoulos et al., 2009**].

L'activité anticancéreuse de nos extraits peut également être attribuée à l'abondance de composés terpéniques. En effet, des études ont démontré l'activité anticancéreuse des terpènes [**Diogo et al., 2010**]. Selon le même auteur, les monoterpènes empêchent le processus de carcinogénèse lors de l'initiation et les étapes progression.

L'alcool piripylique monoterpénique a été décrit comme ayant une activité anti-proliférative contre les cellules de glioblastome par l'inhibition de la pompe Na / K-ATPase [**Garcia et al., 2015**].

D'autres monoterpènes, tel le limonène ont été montré pour prévenir les cancers mammaires, hépatiques, pulmonaires et autres. L'activité de ces constituants est liée à l'activation de la mort cellulaire (apoptose) induite par les protéines caspases dans les cellules cancéreuses [**Michael et al., 1997**].

Notre plante est connue par sa richesse en alcaloïdes, qui ont déjà été citées pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein en inhibant la résistance à l'anoïkis ou l'apoptose induite par le détachement, peuvent prévenir la progression du cancer et les métastases en bloquant les signaux nécessaires à la survie des cellules cancéreuses localisées [**Kim et al.,2004 ;Kim et al., 2012**].

II.2.2. Marquage d'apoptose par l'AO

Dans ce test, nous avons effectué une comparaison entre les cellules témoins et celles traitées par la fraction C sur la lignées PC-3 (a,b) et cellules DU-145 (c,d) (Figure 40).

Nous avons visualisé la présence de plusieurs point jaune dans la base du noyau ce qui montre la condensation de la chromatine dans le noyau et aussi sa fragmentation, nous pouvons aussi reconnaître le bourgeonnement du cytoplasme ce qui confirme l'aspect d'une cellule en apoptose par contre les points en vert montre que les cellules sont vivantes.

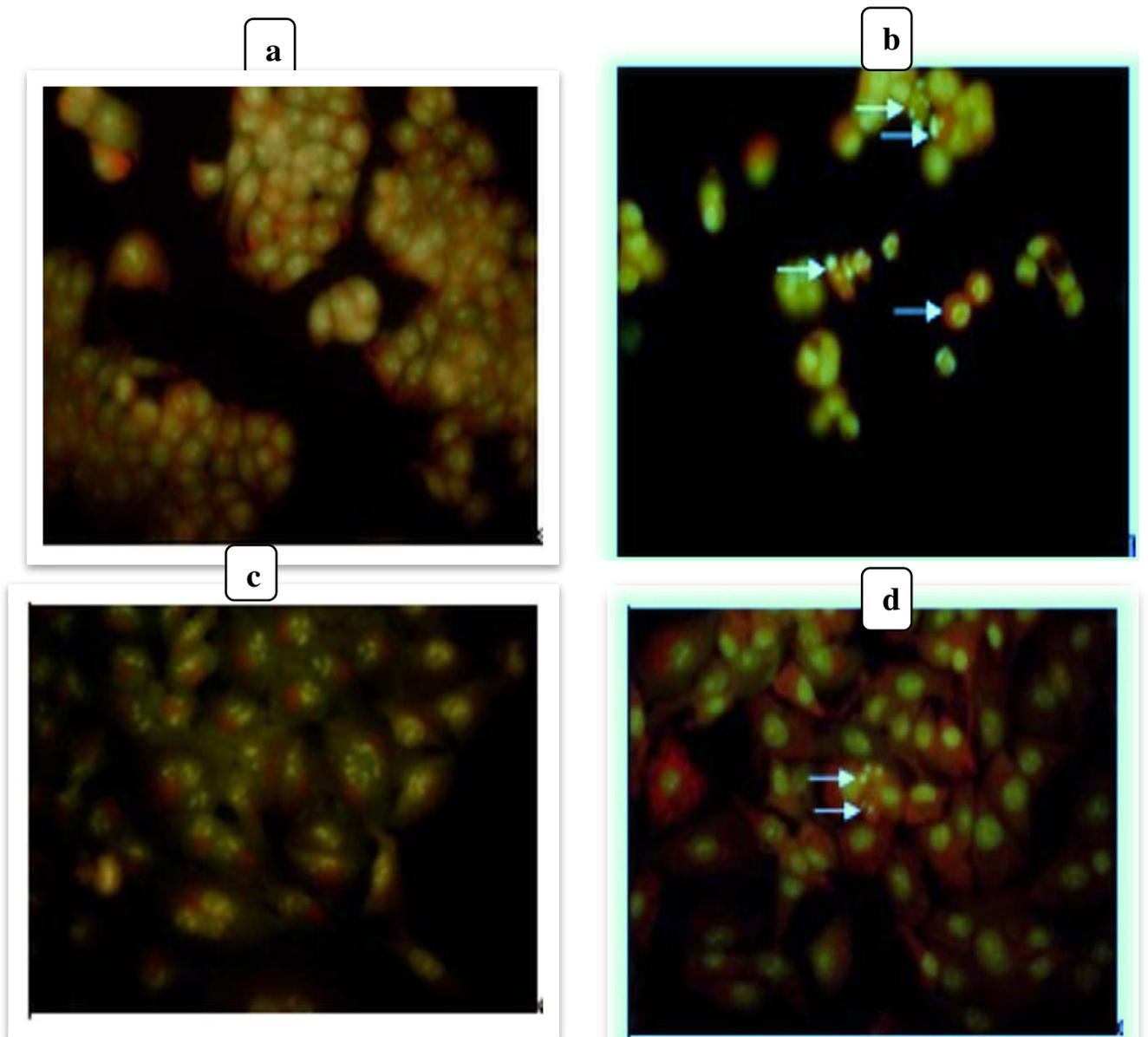


Figure 40. Visualisation de l'aspect morphologique de l'apoptose marqué par l'AO. Comparaison entre les cellules témoins traitées par la fraction C sur la lignées PC-3 (a, b) et cellules DU-145 (c, d).

L'AO a été largement utilisé pour détecter l'apoptose chez le poisson de type sauvage, mutant et médicamenteux semblable à d'autres animaux, dans les embryons de poisson-zèbre, la mort cellulaire programmée maintient l'homéostasie du développement des organes, élimine les cellules excédentaires pour former la morphologie appropriée, et supprime les neurones qui font des connexions inappropriées dans les embryons de poisson de zèbre [Parnng *et al.*, 2004].

Les vésicules acides peuvent présenter une luminescence orange ou rouge, tandis que les vésicules faiblement acides devraient apparaître vertes ou jaune. Donc les vésicules colorées avec AO apparaissent des vésicules vertes, tandis que les autres sont oranges ou rouges [Pierzynska-Mach *et al.*, 2014]. D'après la même équipe, ce colorant fluorescent traverse facilement la membrane cellulaire. A cause de sa faible propriété basique, il s'accumule dans les lysosomes, qui ont un pH bas à l'intérieur, dû à une pompe à protons ATP-dépendante, présente dans leur membrane. Une fois à l'intérieur, le colorant est protoné et devient, par ce biais, piégé dans ces organelles [Pierzyńska-Mach *et al.*, 2014].

La capacité des lysosomes à accumuler de l'AO reste parfaitement intacte au cours des premiers stades de l'apoptose, alors qu'elle est immédiatement perdue lors de la nécrose. Cette différence peut être exploitée pour la discrimination entre l'apoptose et la nécrose [Wlodkowic *et al.*, 2010].

La liaison monomérique de l'Aa à l'ADN cellulaire conduit à une fluorescence verte, tandis que la liaison polymérique de l'acridine orange aux lysosomes conduit à une fluorescence rouge [Erenpreisaet *al.*, 2018].

Pendant l'apoptose, la fluorescence rouge n'est pas modifiée, à cause de la membrane lysosomiale intacte, tandis que la fluorescence verte peut diminuer en raison de la dégradation de l'ADN, entraînant une augmentation nette du signal rouge dans les cellules apoptotiques. Ceci est en contraste avec les cellules nécrotiques, dans lesquelles le signal rouge est significativement diminué, en raison de la rupture et de la fuite des lysosomes, tandis que la fluorescence de l'ADN vert reste stable, au moins pendant le stade initial [Vermes et Haneen, 1994 ;Pierzynska-Mach *et al.*, 2014].

Un moyen rapide de détecter l'apoptose chez les embryons est la coloration à l'AO [Spreij ,1971]. Cette méthode est rapide, facile et idéale pour le dépistage d'un grand nombre d'embryons [White, 1994]. Les cellules mourantes retiennent sélectivement le colorant AO, peut-être en raison d'altérations à grande échelle du pH [Robbins et Marcus ,1963]. Dans les

cellules vivantes, une coloration peut être observée dans les lysosomes et liée à l'ARN et à l'ADN. Cependant, la coloration est beaucoup plus importante dans les cellules mourantes [Canonico et Bird ,1969 ; Bonini ,1993].

Un inconvénient de cette méthode de coloration est la nature transitoire de la coloration. La visualisation de l'apoptose devrait être faite dans les 15 minutes suivant la coloration, car le colorant est rapidement blanchi pendant l'imagerie [Sarkissian *et al.* ,2014].

II.2.3. Activité cytotoxique des molécules

Les différents composés ont été séparés des extraits plus actifs C et F: P1 FC (produit 1 fraction C), P2 FC (Produit 2 Fraction C) , Ph FF (produit h fraction F), P3 FF (produit 3 fraction F). Afin d'étudier l'effet des composés purifiés, nous avons traité la lignée cellulaire du cancer de la prostate plus sensible DU-145, et les cellules de glioblastome (LN-229, U-87 MG) pendant 72 heures. Les données de l'IC50 ont indiqué que toutes les lignées cellulaires étaient constamment sensibles à P1 FC d'une manière dépendante de la dose.

Au niveau des cellules PC-3 et LN-229, l'IC50 n'a pas été achevé avec la concentration maximale utilisée (1000µM) pour le produit FC P02.

Cette différence de sensibilité cytotoxique était plus prononcée dans la lignée de la prostate DU-145 qui est plus sensible (156 µM) en comparaison avec les autres lignées cellulaires de cancer de la prostate et de glioblastome. Les données de viabilité cellulaire ont également démontré que seules les cellules MG U-87 réagissaient au traitement par Ph FF, avec une CI50 significativement réduite (58 µM). La même lignée cellulaire répondait également au traitement avec P3 FF mais à la concentration la plus élevée testée (1000µM) (Figure 41).

Tableau 07. Valeurs IC50 des produits de la fraction C et la fraction F de *H.albus* sur les lignées cellulaires DU-145, PC-3, LN-229 et U-373 MG pour les traitements de 72 h.

Lignées cellulaires	FC P01 IC50 µM	FC P02 IC50µM	FC P03 IC50µM	DMSO FC µM IC50	FFP03 IC50µM	Ph FF IC50	DMSO IC50µM
DU-145	156±16.23	417 ±7.45	445±30.23	689 ±21.2	150 ±8.2	520 ±5.3
PC-3	298 ±4.12	216 ±1.2	631 ±6.60
LN-229	221±5.23	903 ±17.45	43 ±2.23	889 ±3.45
U-373 MG	272 ±20.2	894 ±12.23	1000 ±11.02	965 µM	500 ±4.5	58 µM

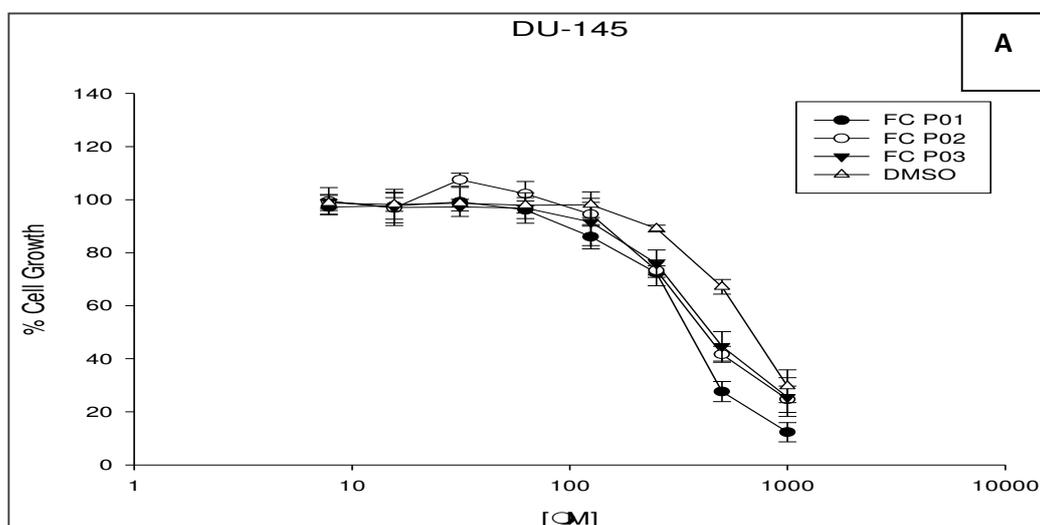
Les valeurs sont la moyenne de trois expériences ± s.d.

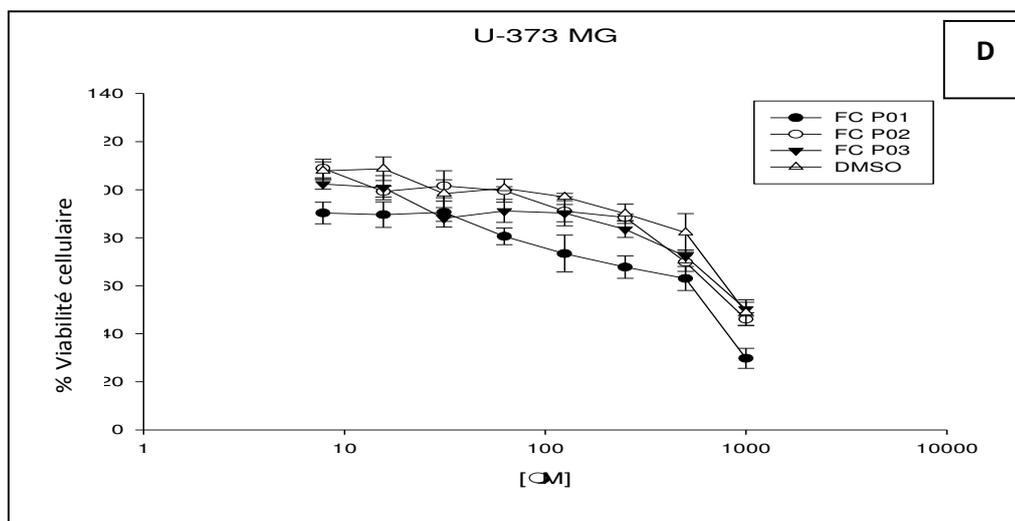
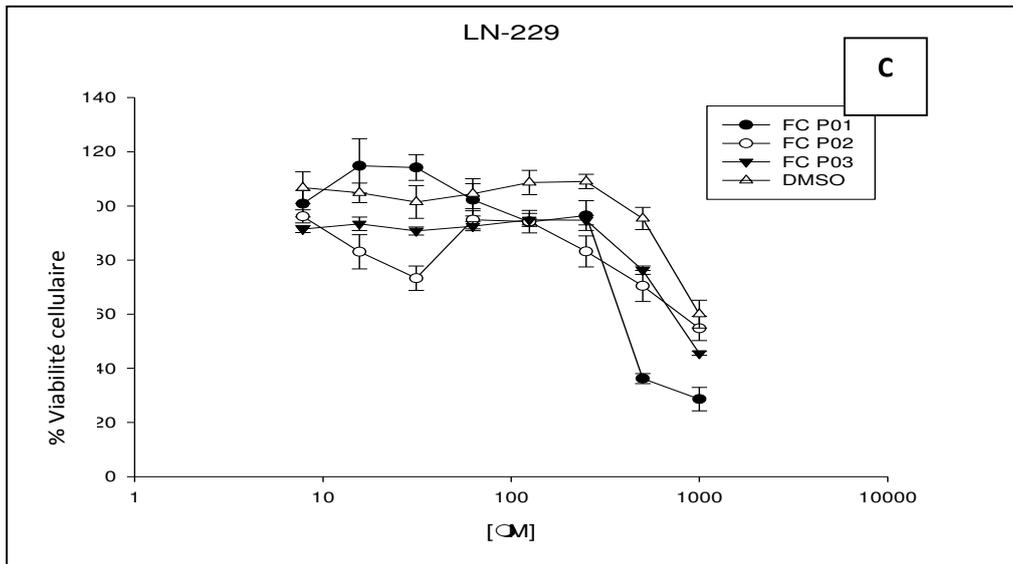
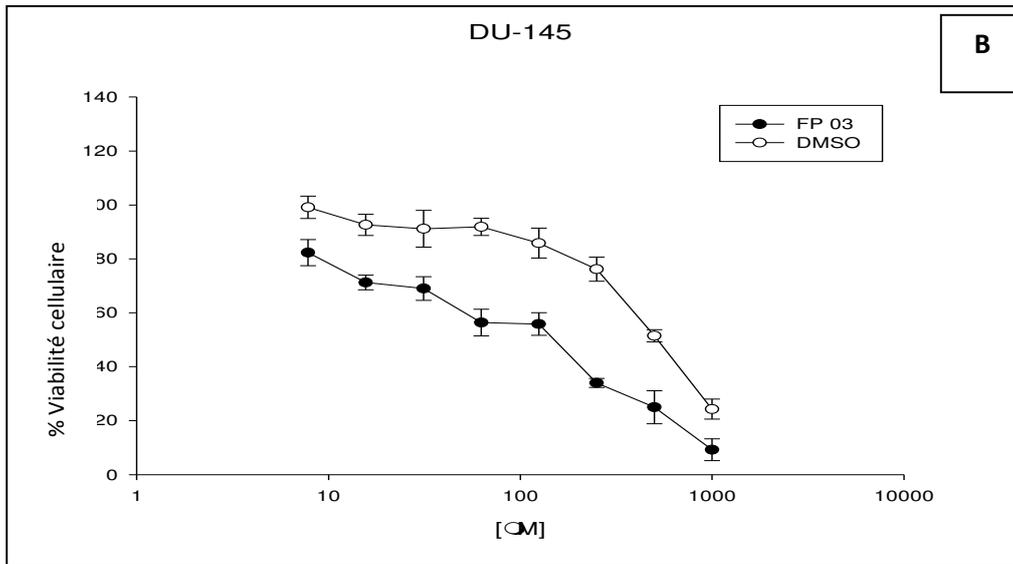
Les données de l'IC50 ont indiqué que toutes les lignées cellulaires étaient constamment sensibles à FC P01 d'une manière dépendante de la dose.

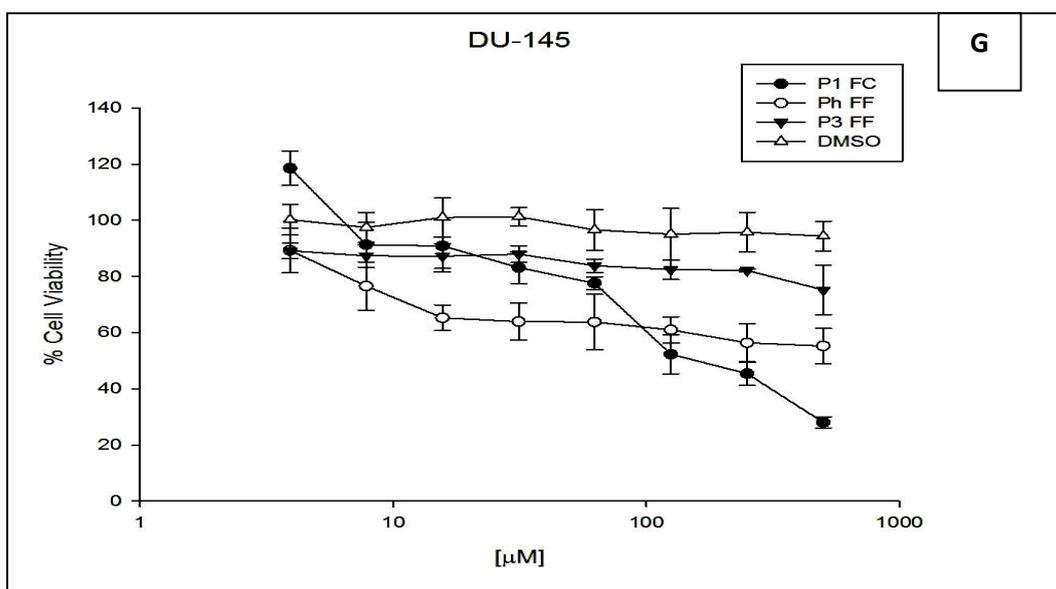
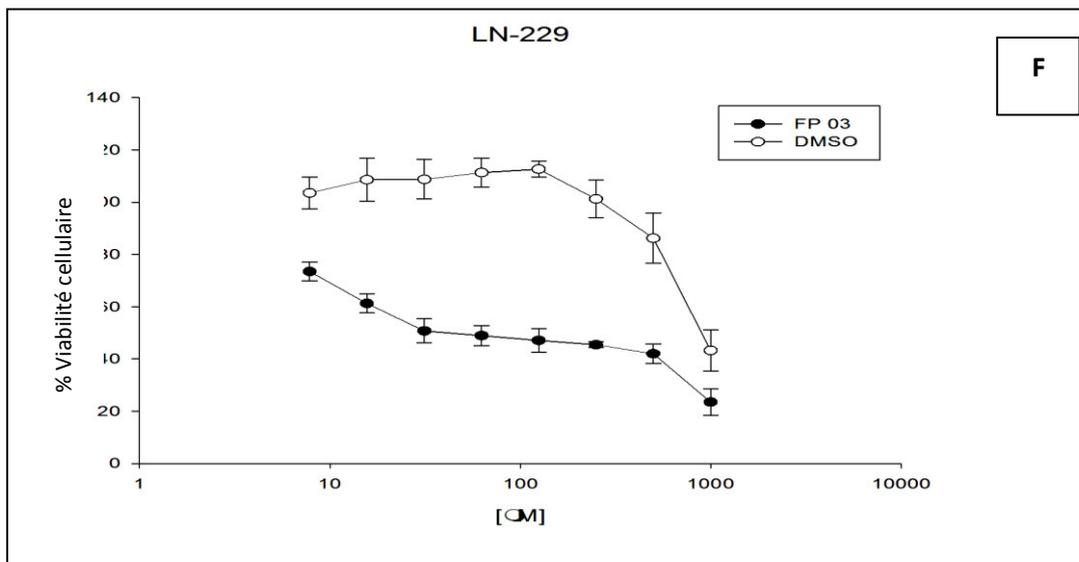
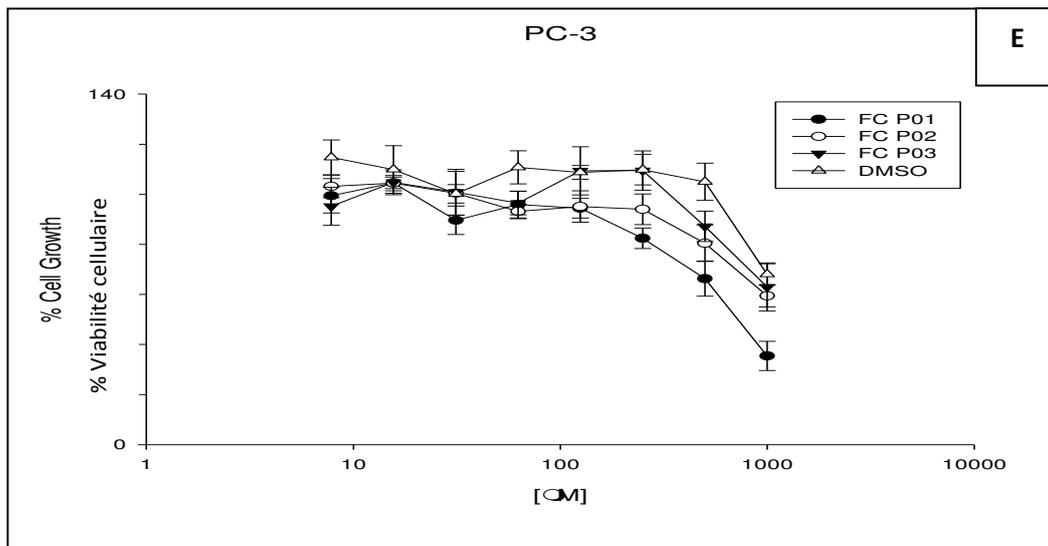
Le produit FC P01 était plus actif d'une façon significative ($P \leq 0.0001$) que FC02 et FC03 et induit 50% (IC50) de l'inhibition de la croissance cellulaire sur les lignées cellulaires étudiées en l'occurrence : DU-145(156 µM) et sur LN-229 (221 µM) lignées cellulaires.

Les produits FC P02 et FCP03 ont induit une inhibition de la prolifération des cellules DU-145 mais ça ne dépend pas de l'effet des produits mais aussi de la cytotoxicité du DMSO. Comme il a été reporté à l'histogramme, la croissance cellulaire a été inhibée à 67% par le DMSO.

De façon intéressante le produit FC P01 a induit 64% de la mort des cellules par rapport au DMSO 34% dans les lignées cellulaires LN-229 et PC-3 respectivement (Tableau 07 et Figure 37)







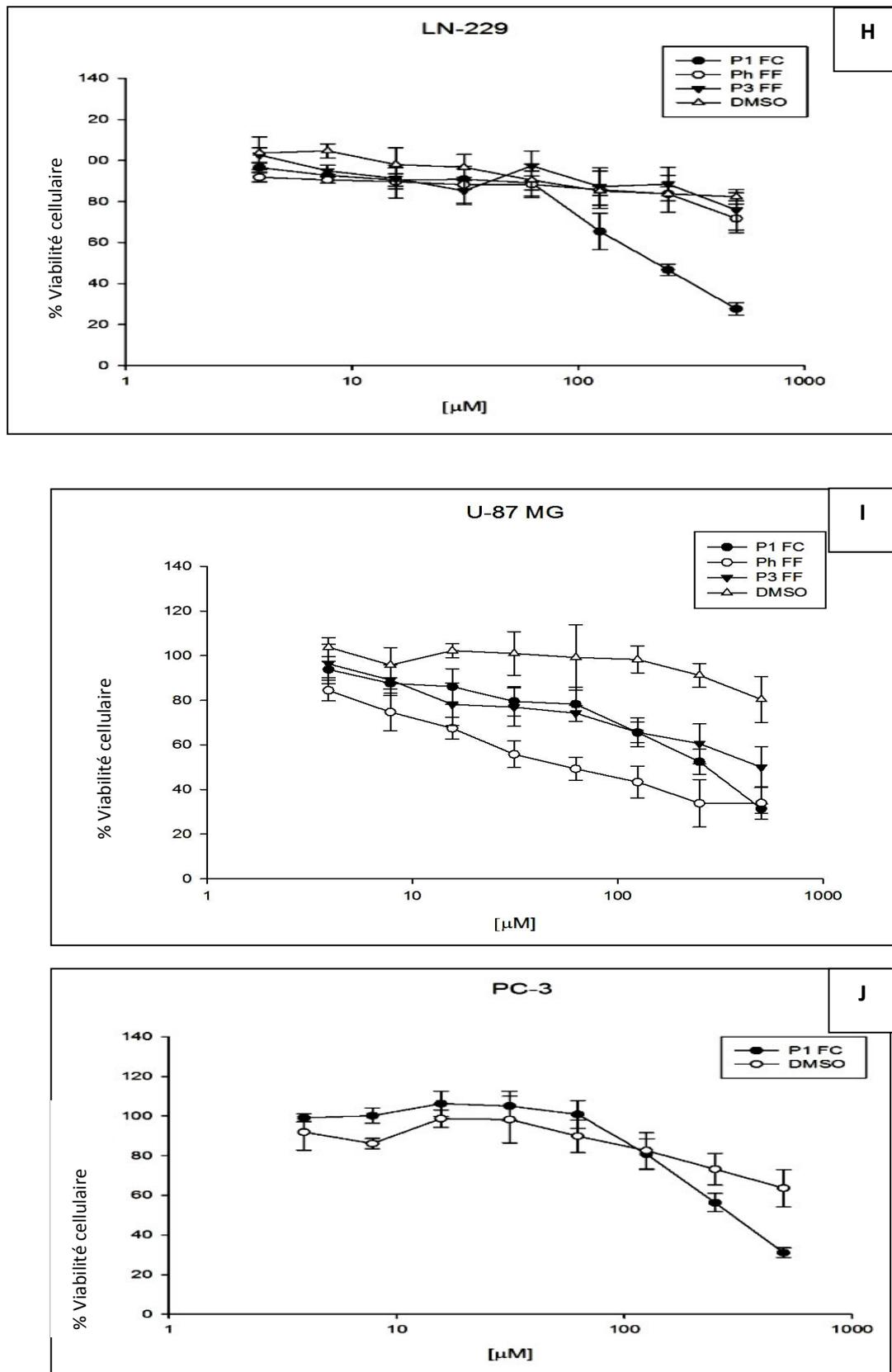


Figure 41. Les graphes (A,B ,C,D,E,F,G,H,I,J) montrent les effets cytotoxiques des produits purifiés de la fraction C de *H.albus* sur DU-145, PC-3, LN-229 , U-373 MG et U-373 MG, respectivement, pour des traitements de 72 h. Test MTT a été utilisé pour évaluer l'effet cytotoxique des produits et les

graphiques ont été préparés en tant que moyennes \pm écart-type de trois expériences distinctes en utilisant le logiciel statistique GraphPad Prism 6.

La molécule FC P02 correspond à l'atropine, l'atropine est considérée comme un médicament anticholinergique largement utilisé, pourrait avoir des effets indésirables sur la santé humaine [Mintezr *et al.*, 2000].

Wen *et al.*, (2016) a révélé que l'effet cytotoxique de l'atropine sur l'endothélium cornéen humain (HCE) et ses mécanismes possibles, les résultats ont montré que l'atropine à des concentrations supérieures à 0,3125 g / L pouvait induire une morphologie anormale et une diminution de la viabilité cellulaire d'une manière dépendante de la dose et du temps *in vitro*.

La cytotoxicité de l'atropine a été prouvée par la diminution de la densité induite et l'anomalie de la morphologie et de l'ultrastructure des cellules CCE. L'atropine pourrait également induire une augmentation de la perméabilité membranaire, de l'arrêt de phase G1, de la phosphatidylsérine, de la fragmentation de l'ADN, et la formation du corps apoptotique des cellules HCE [Wen *et al.*, 2016].

Le même auteur a prouvé que l'atropine avec une concentration de 2,5 g / l pourrait également induire une activation de la caspase-2,3 et 9, une perturbation du potentiel transmembranaire mitochondrial, une régulation négative des Bcl-2 et Bcl-xL anti-apoptotiques, une régulation positive de Bax et Bad pro-apoptotiques du cytochrome c cytoplasmique et du facteur induisant l'apoptose.

En fait, les alcaloïdes sont parmi les composants actifs les plus importants dans les plantes, et certains de ces composés ont déjà été développés avec succès en médicaments chimiothérapeutiques, tels que la camptothécine, un célèbre inhibiteur de la topoisomérase I [Huang *et al.*, 2007].

Plusieurs alcaloïdes présentent des activités biologiques importantes, comme l'action soulageante de l'éphédrine pour l'asthme, l'action analgésique de la morphine, et les effets anticancéreux de la vinblastine [Benyhe, 1994 ; Li *et al.*, 2007].

Les composés qui inhibent l'initiation du cancer sont traditionnellement appelés agents bloquants, ces composants présents dans les plantes peuvent prévenir la carcinogénèse en bloquant l'activation métabolique, l'augmentation de la désintoxication [Keum *et al.*, 2004].

Ils peuvent agir en empêchant l'interaction entre les cancérigènes chimiques ou les radicaux et libres endogènes de l'ADN, réduisant ainsi le niveau de dommages et résultant des mutations qui contribuent non seulement à l'initiation du cancer, mais aussi l'instabilité

génomique progressive et la transformation néoplasique globale [Valco *et al.*,2007 ;Yuet *al.*,2007].

Les alcaloïdes dans les herbes naturelles ne sont pas toujours sans danger ont des effets secondaires conduisent à la toxicité [Lu *et al.* , 2012], comme la neurotoxicité, l'immunotoxicité et la toxicité pour la reproduction, et l'hépatotoxicité et la toxicité embryonnaire peut aussi être induite par la sanguinarine [Unchern *et al.*,1997, Sun *et al.*,2009 ;Dogra *et al.*,2004].

Ph FF correspond à la quercétine-3 -D-glucopyranosyl-(1 6)-B-D-glucopyranoside (QCGG) , Talcott ,(2003) et Talcott et Percival,(2005) ont démontré que ce flavonoïde exerce des effets anticancéreux et anti-inflammatoires en raison de son caractère antiprolifératif et de sa pertinence dans l'activité antihypertensive et neurotrophe[Haghiac et Walle , 2005 ; Senthilkumar , 2010 ;Zhang *et al.*, 2012].

La capacité de la quercétine à induire un arrêt du cycle cellulaire justifie également une investigation supplémentaire car des découvertes contradictoires ont été rapportées. Par exemple, il semble que le traitement par la quercétine pourrait entraîner l'arrêt du cycle cellulaire à G0 / G1 dans la leucémie ou la phase S dans le carcinome colorectal ou les phases G2 / M du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires du cancer du sein, de la leucémie et de l'adénocarcinome œsophagien [Choi *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008].

Les composés polyphénoliques naturels ont une considération intéressante pour leur effet préventif contre le cancer. En tant qu'effet anticancéreux, un effet inhibiteur sur l'angiogénèse serait important [Matsubara *et al.*,2004].

Récemment, il a été montré que la quercétine a une activité anti-angiogénique et est un puissant agent anticancéreux. Cependant, l'activité de ses formes glycosylées et des dérivés apparentés n'a pas encore été étudiée [Zhao *et al.*, 2013].

Matsubara *et al.*, (2004) a trouvé que la quercétine 3-O-β-D-glucose (isoquercitrine) a montré l'effet inhibiteur le plus fort sur un test d'angiogénèse *in vivo*, mais la quercétine 3-O-β-D-glucose- [1,6] -O-α-L-rhamnose (rutine) n'a eu aucun effet. L'effet inhibiteur de la quercétine 7-O-β-D-glucose (quercimeritrine) était presque similaire à celui de la quercétine. De plus, ils ont comparé l'activité des isoquercitrines acylées (cinnamate d'isoquercitrine, dihydrocinnamate, p-coumarate et 2-naphtalate). En conséquence, l'activité anti-angiogénique des dérivés d'isoquercitrine était plus faible que celle de l'isoquercitrine.

FF-P3 qui correspond au N-trans-Feruloyltyramine un alcaloïde qui montre un effet cytotoxique sur les trois lignées cellulaires DU-145, PC-3, LN-229, U-373 MG .

Sarker *et al.*, (2000) ont montré que l'écorce de la plante *B. aegyptiaca* s'est avérée riche en deux types d'alcaloïdes (N-trans-feruloyltyramine et N-feruloyltyramine) en plus de l'acide vanillique, acide syringique; et 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1-propanone.

Les alcaloïdes ont un rôle considérable dans le traitement du cancer et la prévention en tant que médiateur du signal de transduction dans la prolifération cellulaire ainsi que l'inhibition de l'angiogenèse via le blocage des récepteurs tyrosine kinase [**Cook et Figg, 2010**].

Les récepteurs tyrosine kinase inhibiteurs (RTKI) tels que le sunitinibe, le sorafénibe et le semaxanibe sont des alcaloïdes antiangiogènes puissants dans le domaine clinique pour le traitement du cancer [**Laneuville *et al.*, 2018**].

Ces alcaloïdes exercent leur activité en inhibant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR). Ces inhibiteurs de RTK sont particulièrement utiles dans le ciblage des cellules cancéreuses en raison de leur double fonction dans l'inhibition de la transmission du signal onco-protéique et blocage de processus de l'angiogenèse [**Wilhelm *et al.*, 2008**]. En outre, ils ciblent souvent plus qu'un type de récepteur et affectent les deux cellules endothéliales et malignes parce que les récepteurs sont exprimés sur les deux types de cellules [**Staton *et al.*, 2009**].

L'effet antiprolifératif du composé P1 FC qui correspond à N1-Hydrocaffeoyl-N8-caffeoylspermidine a été également testé sur d'autres lignées cellulaires : UM-SCC-103 (lignée cellulaire de cancer de la langue), PC-3, SAOS-2 (lignée cellulaire d'ostéosarcome) et qui a des résultats significatives sur DU-145 (156 μ M).

Le N1-Hydrocaffeoyl-N8-caffeoylspermidine est parmi les polyamines (PA) qui sont de petits polycations aliphatiques largement distribués dans la nature. Ils ont été décrits pour la première fois en 1678 par Antonie van Leeuwenhoek dans le liquide séminal, ce qui a permis de nommer deux de ses membres spermine (Spm) et spermidine (Spd) [**Fleming *et al.*, 2017**].

Szumilak *et al.*, (2017) ont testé l'effet de quelques dérivés de PA, ces composés testés ont été évalués *in vitro* sur des lignées cellulaires d'adénocarcinome prostatique métastatique humain (PC3), de carcinome humain (DU145) et d'adénocarcinome de la glande mammaire (MCF7). La viabilité cellulaire a été estimée sur la base de l'activité métabolique mitochondriale

en utilisant du tétrazolium hydrosoluble pour établir des concentrations efficaces des composés testés dans des conditions expérimentales.

Le potentiel cytotoxique des dérivés de PA a été déterminé par la mesure de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH) libérée par les cellules endommagées, les changements dans le potentiel membranaire mitochondrial, l'analyse de distribution du cycle cellulaire et le dosage de l'apoptose. Il a été révélé que les dérivés de PA testés différaient nettement dans leur activité antiproliférative. Le dérivé de bischromane 5a présente un effet plutôt cytostatique que cytotoxique sur les cellules testées, tandis que le dérivé de quinoléine 3a modifie l'intégrité de la membrane cellulaire, inhibe la progression du cycle cellulaire et induit l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate et du sein.

II.2.4. Effet de médicament anticancéreux

Nous avons évalué l'inhibition proliférative d'un médicament chimiothérapeutique, le DTX, largement utilisé en pratique clinique sur quelques lignées cellulaires comme le DU-145, le LN-229 et le U-2 OS.

La viabilité cellulaire a été évaluée après 72 heures de traitement en utilisant un dosage MTT, comme étant décrit dans "Matériels et Méthodes".

Nous avons trouvé que ce médicament utilisé a montré une action dose-dépendante et anti-proliférative dans toutes les lignées cellulaires testées. Le DTX a induit une inhibition proliférative de 50% (IC50) à 0,6766 ng /ml, 5,25 ng /ml et 1,08 ng / ml sur les lignées DU-145, LN-229 et U-2 OS respectivement (Tableau 08 et figure 40).

La lignée DU-145 est plus sensibles par rapport aux autres lignées cellulaires car le DTX représente sur elle une forte IC50 (0,6766 ng /ml =0.0006766 µg/ml) qui est inférieur d'une façon significative ($P \leq 0.0001$) par rapport aux autres IC 50 sur LN-229 et U-2 OS.

Tableau 08. Valeurs IC50 de DTX sur les lignées cellulaires DU-145, LN-229 et U-2 pour les traitements de 72 h.

Lignées cellulaires	DTX IC50(ng /ml)
DU-145	0.6775 ±0.045
LN-229	5.25 ± 0.22 ***
U-2 OS	1.08 ±0.04 ***

Les valeurs sont la moyenne de trois expériences ± s.d. Différence significative ($P \leq 0.0001$) entre DU-145 et les deux autres lignées cellulaires.

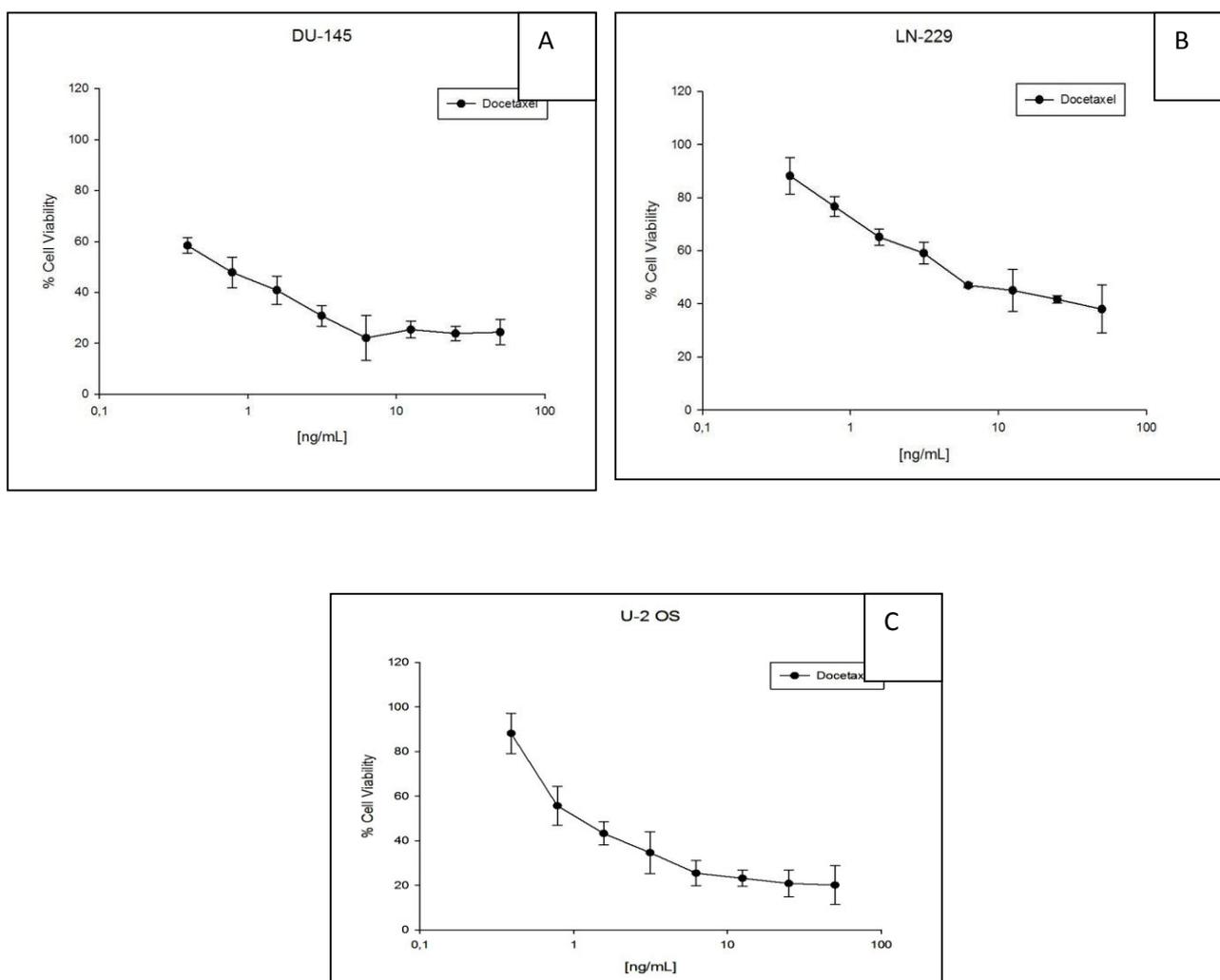


Figure 42. Graphes (A,B et C) montrent les effets cytotoxiques de DTX sur DU-145, LN-229 et U-2 OS respectivement, pour des traitements de 72 h.

Le DTX a une excellente efficacité contre un large spectre de cancers[Aapro ,1996].

D'après Dreicer et Klein, (2001) la formulation clinique actuelle a limité son utilisation, car il provoque des effets secondaires graves. Diverses nanoparticules polymères ont ainsi été développées en tant que formulations alternatives de DTX, mais elles ont surtout été fabriquées à l'échelle du laboratoire. Auparavant, ils ont synthétisé un nouveau copolymère, poly (lactide) -D- α -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate (PLA-TPGS), et a constaté qu'il présentait un grand potentiel dans l'administration de médicaments avec des propriétés améliorées.

L'effet de plusieurs variables de formulation sur les propriétés des nanoparticules chargées en DTX, y compris la taille des particules, le potentiel zêta et l'efficacité d'encapsulation du médicament, a été étudié en fonction du type et de la concentration en tensioactif, la taille, les cycles transmembranaires et la pression de fonctionnement [Kevinet *al.*,2013].

Le DTX est un médicament chimiothérapeutique classé comme un alcaloïde végétal, un taxane et un agent antimicrotubulaire [Lavelle *et al.*, 1995 ; Kaplow ,2005]. Le DTX a été approuvé dans le traitement du cancer du sein, du cancer avancé de l'estomac, du cancer de la tête et du cou et du cancer de la prostate métastatique. Il est également étudié pour traiter le cancer du poumon, de l'ovaire, de la vessie et du pancréas.

Le DTX a été utilisé généralement avec le cisplatine, le fluorouracile ou le carboplatine [Forastiere *et al.*, 1992 ; De Andres *et al.*,1995 ; Schrijvers *et al.*,2004] et la radiothérapie. La chimiothérapie pré-opératoire ou la radiothérapie associée au DTX avant une chirurgie extensive du carcinome épidermoïde oral (OSCC) a été très fréquemment utilisée [Herskovic *et al.*, 1992].

Cependant, le DTX induit des effets secondaires tels qu'une neutropénie, une neuropathie, une stomatite sévère et une altération de la fonction hépatique [Muro *etal.*,2004 ; Raisch *et al.*,2011 ; Yared et Tkaczuk, 2012].

Il existe un certain nombre de rapports sur l'utilisation clinique du DTX et des articles de recherche sur les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par le DTX dans les cellules tumorales à l'exception des lignées cellulaires OSCC [Braakhuis *et al.*, 1994 ; Katsumata *etal.*,2005]. De plus, les études comparatives des effets du DTX sur les cellules orales normales et tumorales sont limitées [Iida *et al.*, 2013].

Hill *et al.*, (1994) a prouvé que les effets cytotoxiques *in vitro* du DTX sont avérés dépendants du temps et de la concentration, parmi treize lignées cellulaires humaines provenant de divers types de tumeurs, l'exposition à des concentrations croissantes de DTX pendant 24 heures a entraîné une courbe dose-réponse, suggérant que l'augmentation de la mortalité cellulaire dépend davantage de la durée d'exposition que de la concentration , les concentrations de IC50 variaient de 0,13-3,3 ng /ml sur trois lignées de neuroblastomes se révèlent les plus sensibles et trois lignées de carcinome du sein et deux du colon montrant une sensibilité moindre.

II.2.5. Evaluation de l'effet apoptotique de Ph FF et P01 FC sur la lignée LN-229

Les processus apoptotiques ont une signification biologique étendue ; il est impliqué par exemple dans le développement, la différenciation, la prolifération ou l'homéostasie, la régulation et la fonction du système immunitaire et l'élimination des cellules nuisibles défectueuses [Wyllie ,1997 ; Fan *et al.*, 2005 ; Elmore ,2007].

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui supprime ou élimine les cellules ciblées indésirables ou mortes. Outre les cellules rétrécies, les caractéristiques des cellules apoptotiques comprennent la condensation du cytoplasme et du noyau, l'agrégation de la chromatine et formation de vésicules liées à la membrane connue sous le nom de corps apoptotiques [Cohen, 1993].

La nécrose d'un autre côté se réfère à une activité pathologique. La nécrose est connue pour être pro-inflammatoire et est marquée par le gonflement de la cellule est souvent accompagnée de condensation de la chromatine. Les cellules nécrotiques ont finalement connu la lyse cellulaire et nucléaire au long avec une inflammation ultérieure [Wyllie *et al.*, 1980], ce qui serait défavorable pour un agent anticancéreux.

Afin d'étudier les mécanismes biochimiques sur la base de l'inhibition de la croissance cellulaire, nous avons évalué les effets de P01 FC et Ph FF sur l'apoptose par un double marquage des cellules LN-229 avec Annexin V et de PI au FACS.

Les quadrants inférieurs gauches de chaque panneau montrent les cellules viables, qui excluent PI et sont négatives pour la liaison FITC-Annexine V. Les quadrants supérieurs gauches contiennent les cellules nécrotiques non viables, négatives pour la liaison FITC-Annexine V et positives pour l'absorption de PI. Les quadrants inférieurs droits représentent des cellules en apoptose précoce qui sont FITC-Annexine V positives et PI négatives. Les quadrants supérieurs à droite représentent les cellules en apoptose tardive, positives à la fois pour la liaison FITC-Annexine V et pour l'absorption de PI.

Après 48 h de traitement, nous avons constaté que les différents traitements n'induisaient pas d'apoptose tardive ni de nécrose dans les cellules LN-229. Au contraire, P01 FC a induit une apoptose précoce dans 14,48% des cellules par rapport au DMSO (9,63%), au Ph FF (3,35%) et au témoin non traité (6,96%) (figure 43 et tableau 09).

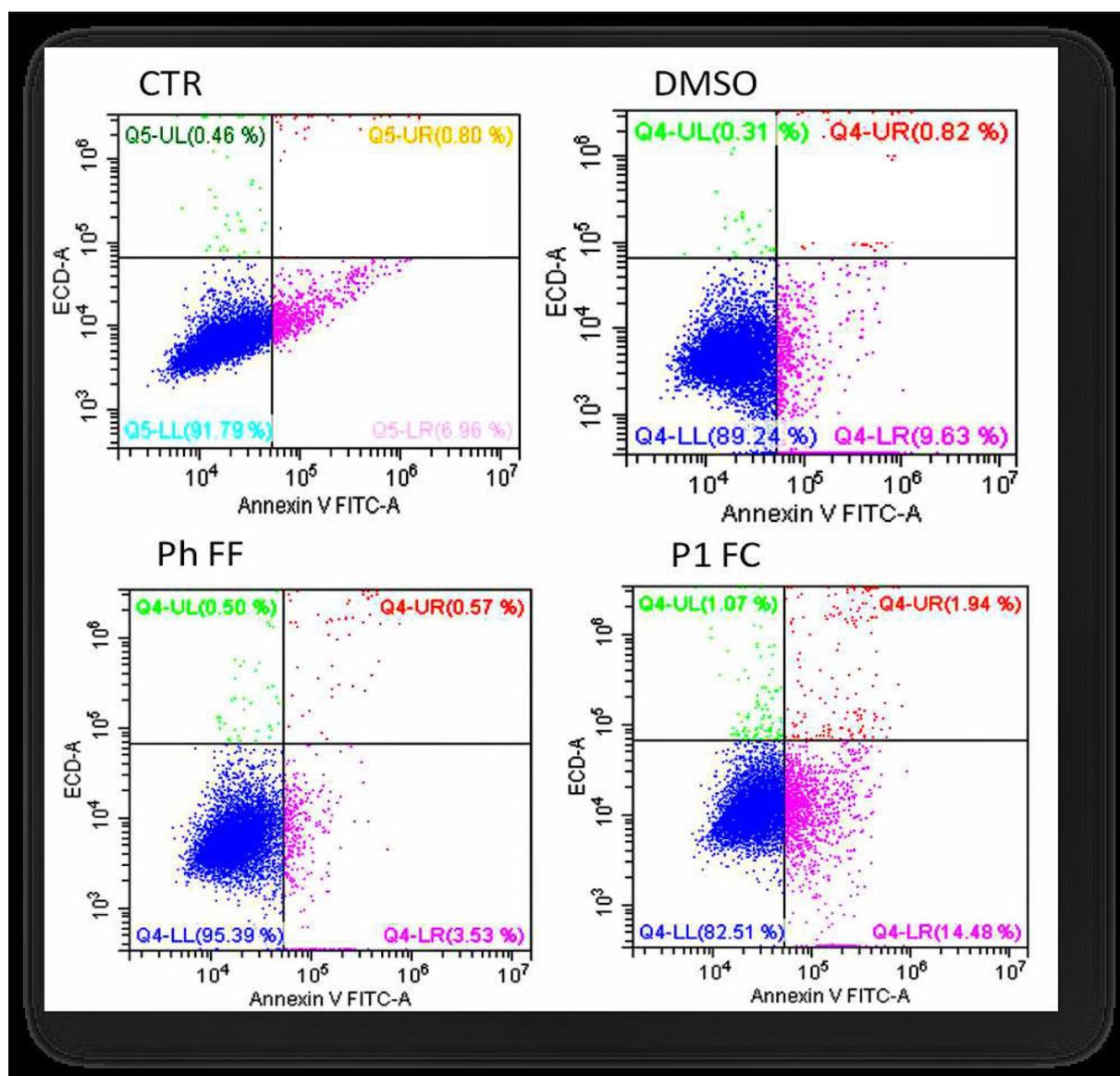


Figure 43. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux après coloration par l'annexine V-PI de cellules LN-229 traitées avec les produits de *H.albus*. (A) contrôle ; (B) DMSO; (C) traité par Ph FF 200 µg / mL ; (D) traité par P01 FC -200 µg / mL.

Tableau09. Pourcentage de populations cellulaires de LN-229à différents stades (vivants, apoptotiques et nécrotiques) suivant le traitement des produits Ph FF et P01 FC après évaluation par double coloration (V-FITC / PI) en utilisant un test de cytométrie en flux.

	Contrôle	DMSO	Ph FF	P01 FC
Apoptose retardée (%)	0.8±0.02	0.82±0.02	0.57±0.09	1.94±0.03
Apoptose précoce (%)	6.96±0.6	9.63±0.6	3.53±0.04	14.48±2.08
Nécrose (%)	0.46±0.04	0.31±0.01	0.5±0.001	1.07±0.02
Cellules vivantes (%)	91.79±3.50	89.24±3.02	95.39±4.20	82.51± 1.02

Les valeurs sont la moyenne de trois expériences ± s.d.

Le potentiel induisant l'apoptose des produits a été testé dans les cellules cancéreuses LN-229 utilisant le test de cytométrie de flux à double coloration l'annexine-FITC / PI.

Les cellules ont été exposées à 200 µg / ml de Ph FF et P1 FC pendant 48 h. La figure 44 montre qu'après 48 h d'exposition les cellules LN-229 sont entrées en phase apoptotique tardive après 48.

Le PhFF et P1 FC ont présenté une apoptose précoce et tardive très significative par rapport au contrôle ($P \leq 0.0001$) tandis qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0.05$) entre le contrôle et le DMSO dans l'apoptose tardive.

Le produit P01 FC est avéré plus actif que PhFF car il présente une apoptose précoce et d'une façon significative par rapport à Ph FF ($P \leq 0.0001$).

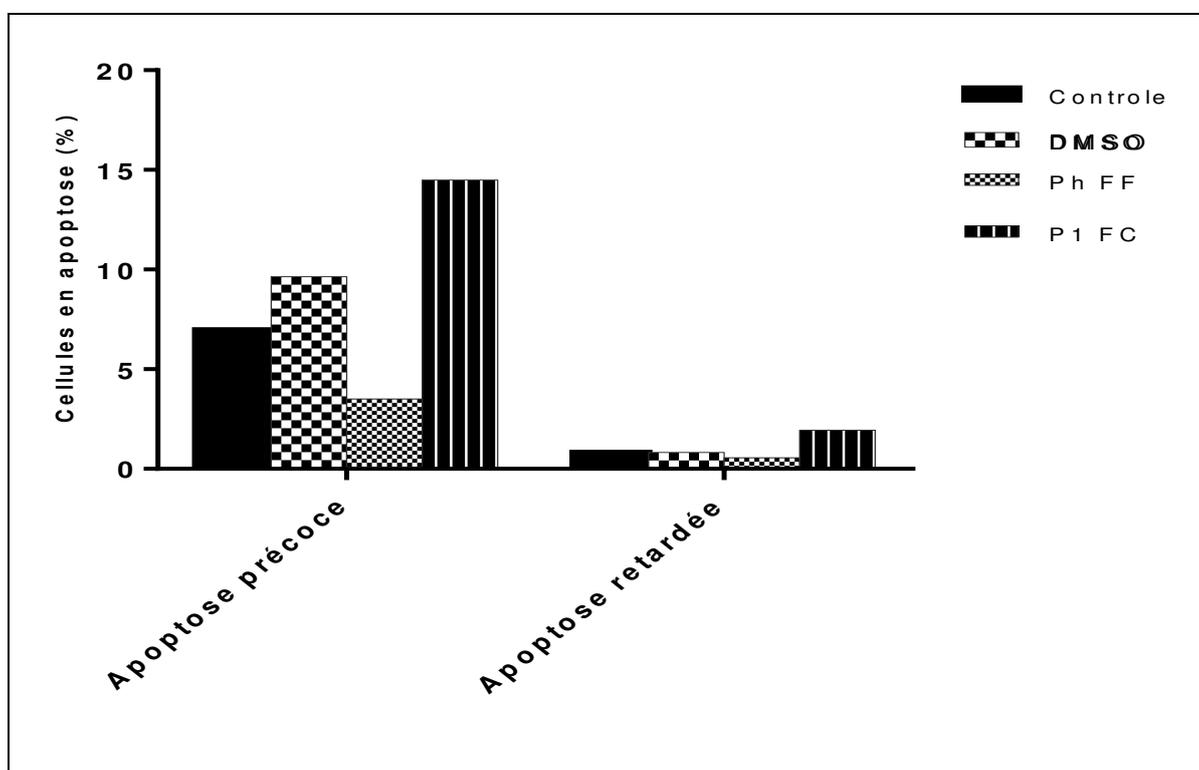


Figure 44. Effet apoptotique des produits de *H.albus* sur la lignée cellulaires LN-229.

La connaissance des techniques de détection des cellules apoptotiques permettra de développer des approches thérapeutiques plus efficaces, plus spécifiques et donc plus tolérables [Archana *et al.*, 2013].

L'annexine V est une protéine de 35 à 36 kDa, dépendante du calcium, qui se lie aux phospholipides et qui a une forte affinité pour le phospholipide phosphatidylsérine (PS). Ce

sont une famille de protéines décrites en 1990, qui partagent toutes la propriété de lier au calcium et les phospholipides [Vermes *et al.*, 1995 ; Verhoven *et al.*, 1999].

Comme établi, l'une des premières indications de l'apoptose est la translocation de la membrane PS de la foliole interne à la foliole externe de la membrane plasmique. Cela précède d'autres processus apoptotiques tels que la perte d'intégrité de la membrane plasmique, la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine [Wlodkowoc *et al.*, 2011].

L'annexine V se lie à ces PS en exposant les membranes de manière dépendante du calcium. Il est souvent utilisé conjointement avec des colorants vitaux tels que la 7-amino-actinomysine (7-AAD) ou le PI, qui se lient aux acides nucléiques, mais ne peuvent pénétrer la membrane plasmique que lorsque l'intégrité de la membrane est rompue dans les derniers stades de l'apoptose ou de la nécrose [Heerde *et al.*, 2000].

L'annexine V se comporte comme une membrane extrinsèque, d'où un excellent outil pour détecter la surface cellulaire exposée au PS *in vitro* et *in vivo* et est de loin la technique la plus sensible pour détecter l'apoptose en cours [Petrovsk *et al.*, 2003].

Un inconvénient potentiel est que l'annexine V se lie de préférence aux cellules apoptotiques même dans des conditions de nécrose excessive. Ceci peut être résolu en combinant l'annexine V avec un marqueur d'ADN tel que le PI, qui peut également être utilisé pour suivre la progression de l'apoptose : de la viabilité cellulaire à l'apoptose précoce et enfin à l'apoptose tardive et à la mort cellulaire [Vermes *et al.*, 1995].

Suite à la réception de signaux spécifiques, un certain nombre de changements biochimiques et morphologiques se produisent dans la cellule. Une famille de protéines connues sous le nom de caspases, et peut-être d'autres protéases, sont activés dans les premiers stades de l'apoptose. Ces protéines clivent des substrats cellulaires qui sont nécessaires pour la fonction cellulaire normale, y compris les protéines structurelles dans le cytosquelette et les protéines nucléaires [Hassan *et al.*, 2014].

Les caspases peuvent également activer d'autres enzymes de dégradation telles que les DNases, qui commencent à cliver l'ADN dans les régions de liaison entre les oligonucléosomes [Arends, 1990].

Comme les fragments d'ADN sont perdus à cause de l'apoptose et la teneur en ADN nucléaire peuvent être facilement mesurés par le débit de cytométrie, après coloration d'acide

nucléique avec des fluorochromes spécifiques, qui sont des méthodes ont été développées pour une évaluation quantitative des noyaux apoptotiques [Nunez ,2001].

Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un important mécanisme de mort cellulaire qui ne déclenche pas une réponse inflammatoire qui occasionne la destruction collatérale de cellules normales dans le microenvironnement environnant [Elmore ,2007].

La cytométrie est une méthode qui utilise PI pour la coloration nucléaire[Riccardi et Nicoletti , 2006].

PI est un composé fluorogène qui se lie stoechiométriquement aux acides nucléiques afin que l'émission de fluorescence soit proportionnelle à l'ADN (et ARN, qui doit être enlevé si l'ADN doit être mesuré) au sein de la cellule. Lorsque les cellules apoptotiques sont colorées avec PI et analysées avec un cytomètre en flux, Elles présentent un large pic hypodiploïde (sub-G1), qui peut être facilement distingué de l'étroit pic des cellules normales avec la teneur en ADN (diploïde) contenat dans normale dans les canaux de fluorescence rouge [Plasencia *et al.*, 2005 ;Tang *et al.*,2015].

Cette méthode semble offrir un certain nombre d'avantages. Elle permet une estimation rapide, fiable et reproductible de l'apoptose, une analyse simultanée des paramètres du cycle cellulaire de survie des cellules [Alzate *et al.*, 2000].

Pour élucider les voies de la mort cellulaire induite par ces deux produits P01 FC et Ph FF, le renversement de phosphatidylsérine a été évalué en utilisant le l'annexine / PI cytométric de flux. L'exposition de la phosphatidylsérine à la surface extérieure de la membrane cellulaire est généralement acceptée comme l'un des biomarqueurs de l'apoptose [Fadok *et al.*, ,1992].

L'analyse d'Annexin / PI a également a confirmé la capacité de P01 FC à induire une apoptose précoce et tardive. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un mécanisme important de mort cellulaire qui ne déclenche pas une réponse inflammatoire qui occasionne la destruction collatérale de cellules normales dans le microenvironnement [Elmore, 2007].

Ainsi, l'apoptose est un mécanisme de protection qui maintient l'homéostasie tissulaire en enlevant les cellules malades [Fan *et al.*, 2005]. Cependant, les cellules présentent une résistance à l'apoptose pour soutenir leur prolifération incontrôlée et, par conséquent, tout

composé modulateur de l'apoptose est souhaitable en tant qu'agent chimiothérapeutique plausible contre le cancer [Tor *et al.*, 2014].

Selon nos résultatsnotre produit peut jouer un rôle dans la perturbation de ces protéines, mais cet aspect n'a pas été étudié dans cette étude.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les produits naturels jouent un rôle fondamental dans la recherche pharmaceutique autant que médicaments. En effet, on estime qu'environ 40% de tous les médicaments sont des produits d'origine naturels ou dérivés semi-synthétiques.

Lors de ce travail, nous avons évalué l'effet cytotoxique des produits purs isolés de la partie aérienne de la plante *H. albus*.

Le dosage qualitatif a montré la présence des alcaloïdes, les terpénoïdes et les polyphénols.

L'étude phytochimique par les techniques de purification par Séphadex LH 20 a permis l'obtention de cinq fractions (F, E, C, D, G). Ces dernières ont révélé une activité antiproliférative dont les fractions F et C ont l'activité la plus marquée.

Le marquage des cellules traitées par la fraction C ont montrées un aspect morphologique de l'apoptose.

La séparation des produits par la CCM, HPLC préparative, HPLC analytique, spectrométrie de masse et RMN dans les deux fractions (C, F) révèle pour la première fois la présence d'un alcaloïde et deux amides en loccurrence : la quercétin-3-D-glucopyranosyl-(1---6)-B-D-glucopyranoside (Ph-FF), N-trans Feruloyl tyramine (FF-P3) N¹ -(hydro) caffeoyl-N⁸-(hydro) caffeoyl spermidine (FCP01) et l'atropine (FCP02).

Selon nos résultats de l'activité cytotoxique obtenus, on peut conclure que les produits purifiés (FC-p01, FC-p02, FF-ph, FF-p3) ont une activité anticancéreuse modérée par rapport à la molécule de référence (la docétaxel).

Il semble que nos extraits ont une activité considérable sur les lignées de glioblastomes par rapport aux autres lignées en induisant une apoptose précoce, tardive et une nécrose suite à la fixation de l'annexin V / PI.

La molécule (FC-p01) a montré l'activité anti-tumorale significativement la plus élevée par rapport aux autres molécules dans les lignées cellulaires de la glioblastome et la prostate.

Nos résultats ont montré que les produits purifiés et le standard testé témoignent l'activité anticancéreuse *in vitro*. Cependant d'autres études approfondies seront explorer dans des études ultérieures et se résumant dans les points suivants :

- 1) Test de l'activité cytotoxique de la partie racinaire de la plante.
- 2) Couplage des molécules avec des peptides afin d'avoir des bons résultats.
- 3) Identification de d'autres molécules dans la plante surtout dans la partie racinaire.
- 4) Investir d'autres mécanismes moléculaires comme : le marquage des protéines apoptotiques par le Western blot, étude de la perméabilité mitochondriale, la libération du cytochrome c, détection d'autophagie, le pouvoir antioxydant.

Bibliographie

Bibliographie

- Ívarez-barrientos A., Arroyo J., Canto'n R. , Nombela C. and Sa'nchez-pe'REZ M.(2000).**Application of flow cytometry to clinical microbiology.*Clinical microbiology reviews* ;13(2) : 167-195.
- Aapro M. (1996).** The scientific rationale for developing taxoids. *Anticancer Drugs*.;7(2):33–36.
- Aaron J. Smith, Oertle J., Prato D. (2014).** Environmental Carcinogens and the Kinds of Cancers They Cause ;*Journal of Oncology*, 3-1.
- Aguirre L., Arias N., Macarulla M.T., Gracia A., Portillo M.P. (2011).** Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J.*;4:189–198.
- Ahmad W., Jantan I. et Syed Bukhari N.A.(2016).***Tinospora crispa*(L.)Hook.f.&Thomson:AReview of Its Ethnobotanical,Phytochemical,and Pharmacological Aspects ,*Frontiers in Pharmacology* ;7 :59.
- Alam M.S., Chopra N., Ali M., Niwa M. (1996).** Oleanen and stigmaterol derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochemistry* 41: 1197-1200.
- Al-marzook F, Omran R.(2017).** Cytotoxic activity of alkaloid extracts of different plants against breast cancer cell line .*Asian journal of pharmaceutical and clinical research* ;10 (7) :20-28.
- Alvero A. B., Kelly M., Rossi P., Leiser A., Brown D., Rutherford T. & Mor G. (2008).** Anti-tumor activity of phenoxodiol: From bench to clinic. *Future Oncol.* 4(4):475-482.
- Alzate, J. F., A. Alvarez-Barrientos, V. M. Gonzalez, and A. Jimenez-Ruiz. (2006).** Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X_L expression. *Apoptosis* , 11:161-171.
- Amaro C.A., González-Cortazar M. , Herrera-Ruiz M. , Román-Ramos R. , Aguilar-Santamaría L. , Tortoriello J. and Jiménez-Ferrer E.(2014).** Hypoglycemic and Hypotensive Activity of a Root Extract of *Smilax aristolochiifolia*, Standardized on N-trans-Feruloyl-Tyramine, *Molecules*, 19 : 11366-11384; doi:10.3390/molecules190811366
- Androutopoulos V.P., TsatsakisA.M., SpandidosD.A. (2009).** Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention ,*BMC Cancer* ; 9: 187.
- Archana M. , Bastian, Yogesh T.L., Kumaraswamy K.L.(2013).** Various methods available for detection of apoptotic cells--a review., *Indian J Cancer*.50(3):274-83.
- Arends M.J., Morris R.G. and Wyllie A.H.(1990).** Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136 :593–608.
- Ashkenazi A. , Dixit V.M . Death receptors (1998).** Signaling and modulation . *Science* . ; 281 (5381) : 1305 – 1308 .
- Ayoola G.A., Coker H.A., Adesegun S.A., Adepoju A.A. , Obaweya K. , Ezennia E.C.,(2008).** Atangbayila1 Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 3, 1019-1024.

Badmus J.A., Ekpo O.E., Hussein A. A., Meyer M. and D. C. Hiss (2015). Antiproliferative and Apoptosis Induction Potential of the Methanolic Leaf Extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don) *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/756482.1-11>.

Bahuguna A., Khan I. , Bajpai V.K. ,Kangl S.C.(2017). Visual experiment MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug, *Bangladesh J Pharmacol* ; 12: 115-118.

Bassard J.E., Ullmann P., Bernier F., Werck-Reichhar D. (2010). Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism , *Phytochemistry* ;71 :1808-1824.

Batanouny K. H. (1999). Wild Medicinal Plants in Egypt". (With contribution of: E. Aboutabl, M. Shabana& F. Soliman). With support of the Swiss Development Co-operation (SDC). Academy of Scientific Research and Technology, *Egypt. The World Conservation Union (IUCN), Switzerland*. pp. 60-64.

Begum et al. , (2010). Bioactive Non-alkaloidal Secondary Metabolites of *Hyoscyamus niger* Linn. Seeds: A Review , *Research journal of seed science* , 3(4) :210-217.

Begum, S., Saxena, B., Goyal, M., Ranjan, R., Joshi, V., Rao, C., Krishnamurthy, S., Sahai, M. (2010). Study of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of seeds of *Hyoscyamus niger* and isolation of a new coumarinolignan. *Fitoterapia* 81, 178–184.

Benchimol S. (2001). P53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ.* 8: 1049–1051.

Benyhe S.(1994). Morphine, new aspects in the study of an ancient compound. *Life Sci* ;55:969-79.

Bernhardt P., McCoy E., O'Connor S.E.(2007). Rapid identification of enzyme variants for reengineered alkaloid biosynthesis in periwinkle. *Chem Biol.* 2007;14:888–897.

Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S.(2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.*;11:127-52.

Bharate S. B., Manda S., Mupparapu N., Battini N. & Vishwakarma R. A. (2012). Chemistry and biology of fascaplysin, a potent marine-derived CDK-4 inhibitor. *Mini Rev. Med. Chem.* 12(7):650-664

Bicknell G.R., Cohen G.M.(1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*;207:40–47.

Bonini NM, Leiseron WM, Benzer S.(1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell.*;72:379–395

Boshoff C., Whitby D., Hatzioannou T., Fisher C., van der Walt J., Hatzakis A., Weiss R., Schulz T. (1995). Kaposi's-Sarcoma-Associated Herpesvirus in HIV-Negative Kaposi's Sarcoma. *Lancet* ,345: 1043-4.

Bourebaba Y., Durán D., Boulila F., Ahnia H., Boulila A., Temprano F., Palacios J.M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T., Rey L. (2016). Diversity of Bradyrhizobium strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the western Mediterranean: Algeria and Spain. *Syst Appl Microbiol* 39:266–274. doi:10.1016/j.syapm.2016.04.006.

- Braakhuis B.J., Hill B.T., Dietel M., Kelland L.R., Aapro M.S., Zoli W. and Lelieveld P.(1994).***In vitro* antiproliferative activity of docetaxel (Taxotere), paclitaxel (Taxol) and cisplatin against human tumour and normal bone marrow cells. *Anticancer Res*14: 205- 208.
- Bruneton (1999)** . Pharmacognosy: Phytochemistry of Medicinal Plants, *Intercept, UK*, pp. 810–822.
- Byard R.W., R.A. James P. (2002).** Felgate, Detecting organic toxins in possible fatal poisonings—a diagnostic problem, *J. Clin Forensic Med.* 9 :85–88.
- CamposJ., HirschmannS.E., GuzmánL.R., OrregoP.FernándezM.GonzálezC.RadojkoviF. A.ZuñigaL.LampertiE.PasteneC.Aguayo(2014).** Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein,*Food Chemistry* , 151 : 175-181.
- Campos J.J., Azevedo A.O,De Souza Filho J.D.,Perez A.C., Braga F.C.,(2013).**Bioguided isolation of myricetin-3-O-B-galactopyranoside with antinociceptive activity from the aerial part of *Davilla elliptica* St-Hil. *Journal of ethnopharmacology*, 150:270-274.
- Canet D. (1991).**La RMN concepts et méthodes, *Inter éditions*.
- Canonico PG, Bird JW. (1969).**The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle. *The Journal of cell biology*;43(2):367–71.
- Capasso A., Aquino R., Tommasi N.D., Piacente S., Rastrelli L., Pizza C.(2002).** Neuropharmacology activity of alkaloids from South American medicinal plants. *Curr Medi Chem CNS Agents* ;2:1-15.
- Carey J (2000).** A systematic and general proteolytic method for defining structural and functional domains of proteins. *Methods Enzymol* ?328: 499-514.
- Cavin A.,Hostettmann K.,Dyatmyko W.,and Potterat O.(1998).**Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*.*PlantaMed.*64 : 393–396.doi: 10.1055/s-2006-957466
- Chen T., Xu Y., Guo H., Liu Y., Hu P., Yang X., Li X., Ge S., Velu S. E., Nadkarni D. H., Wang W., Zhang R. & Wang H. (2011).** Experimental therapy of ovarian cancer with synthetic makaluvamine analog: In vitro and in vivo anti-cancer activity and molecular mechanisms of action. *PLoS One.* 6(6):e20729.
- Chen Y., Xu Y., Zhu Y. & Li X. (2013).** Anti-cancer effects of ginsenoside compound k on pediatric acute myeloid leukemia cells. *Cancer Cell Int.* 13(1):24.
- Chinnaiyan A.M.(1999).** The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.*;1:5–15.
- Choi J.A., Kim J.Y., Lee J.Y., Kang C.M., Kwon H.J., Yoo Y.D. Kim T.W., Lee Y.S., Lee S.J. (2001).** Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol.*;19(4):837-44.
- Choure A.P.R. and Vaidya N. (2010).** Structurally Modified Atropine molecule by electroanalytical method for its increased ,*J. Chem. Pharm. Res* , 2(6):410-415.
- Cohen J. J. (1993).** Apoptosis,” *Immunology Today*, 14 (3) : 126–130, 1993.

Cook K.M. , Figg W.D.(2010).Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects , *CA. Cancer J. Clin.*, 60 : 222-243.

Cooper GM.(2000).The Development and Causes of Cancer The Cell: A Molecular Approach. *2nd edition.*

Darby S., Hill D., Auvinen A., Barros-Dios J.M., Baysson H., Bochicchio F., Deo H., Falk R. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ.*330: 223-8.

David L. Vaux and Stanley J. Korsmeyer (1999). Cell Death in Development. *Cell*, 96: 245–254, Copyright □1999 by Cell Press

Davis J.M., Murphy E.A., Carmichael M.D.(2009). Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr. Sports Med. Rep.*;8:206–213. doi: 10.1249/JSR.0b013e3181ae8959.

De Andres L., Brunet J., Lopez-Pousa A., Burgues J., Vega M., Tabernero J.M., Mesia R. and Lopez J.J. (1995). Randomized trial of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil *versus* carboplatin and fluorouracil in patients with stage IV-M0 head and neck cancer. *J Clin Oncol* ;13: 1493-1500.

Dejong, J.M., Liu, Y., Bollon, A.P., Long, R.M., Jennewein, S., Williams, D., and Croteau, R.B. (2005) Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* ;93:212–224.

Del Follo-Martinez A., Banerjee N., Li X., Safe S. & Mertens-Talcott S. (2013). Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic micro RNA-27a. *Nutr. Cancer.* 65(3):494-504.

Demain A.L, Vaishnav P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy, *Microb Biotechnol.* ;4(6):687-99.

Dhanani T., Shah S., Gajbhiye N.A., Kumar S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (1): 1193–1199.

Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maiza A., (2004). Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie* , 7:1073-1080.

Dictionary of Natural Products (2003), CRC Press, CD-ROM,Version 11.2.

Diogo G., Garcia Lidia M. F, Amorim, Mauro V., de Castro Faria Aline S., Freire Ricardo E. (2010). The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor *Molecular and Cellular Biochemistry* ;345(1):29–34.

Doerk-Schmitz K.,Witte L.,Alfermann A.W.(1993). Tropane alkaloid patterns in plants and hairy root of *Hyoscyamus albus*,*Phytochemistry*, 35(1):107–110

Dogra R.K., Khanna S., Shanker R.(2004). Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology*;196:229-36.

Dohou N ., Yani K ., Thahrouch S ., Idrissi Hassani L.M ., Badoc A ., mira G .N.(2003). Screeming phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine; *Thynelaea lythroides* .*Bull..Soc.Pharm.Bordeaux*, 142:61-78.

- Drager B.(2002).** Analysis of tropane and related alkaloids, *J. Chromatogr. A* 978 : 1–35.
- Dreicer R., Klein E.A.(2001).** Preliminary observations of single-agent docetaxel as neoadjuvant therapy for locally advanced prostate cancer. *Semin Oncol.*;28(4):45–48.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.(2000).**Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.*;102:33–42.
- Du H., Xu B., Wu C., Li M., Ran F., Cai S. & Cui J. (2012).** Effects of CS-1 on A431 cell proliferation, cell cycle, and epidermal growth factor receptor signal transduction. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)*. 44(2):136-146.
- Efdi M., Ohguchi K., Akao Y., Nozawa Y., Koketsu M., Ishihara H. (2007).** N-trans-feruloyltyramine as a melanin biosynthesis inhibitor.*Biol Pharm Bull.*;30(10):1972-4.
- Elmore G., Longton G.M., Pepe M.S., Carney P.A., Nelson H.D.et al., (2017).** A randomized study comparing digital imaging to traditional glass slide microscopy for breast biopsy and cancer diagnosis .*J Pathol Inform* ,8:12.
- Elmore S. (2007).** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* ; 35(4) :495–516.
- Engel T., Henshall D.C. (2009).** Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *IJPPP* 1:97–115.
- Erenpreisa J., Krigerts J., Salmina K.,Selga T. , Sorokins H., and FreivaldsT. (2018).** Differential staining of peripheral nuclear chromatin with Acridine orange implies an A-form epichromatin conformation of the DNA , *Nucleus.*; 9(1): 171–181.
- Evans W.C. (2002).** Pharmacognosy. *15th edition W.B. Saunders, Toronto, Harcourt Pub Ltd.*, pp: 516-525.*Experiments*, no. 50, Article ID e2597.
- Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., and Henson P. M. (1992).** Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* ; 148(7) : 2207–2216.
- Fan T.J., Han L.H., Cong R.S., and Liang J. (2005).** Caspase family proteases and apoptosis,” *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37 (11) :719–727.
- Fang E.F., Zhang C.Z., Zhang L., Wong J.H., Chan Y.S., Pan W.L. et al (2012).** Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation in Both Cell Lines and Nude Mice by Promotion of Apoptosis , *PLoS One.* ; 7(9): e41592.
- Fang S.C., Hsu C.L., Lin H.T., Yen G.C. (2010).** Anticancer effects of flavonoid derivatives isolated from *Millettia reticulata* Benth in SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells. *J Agric Food Chem* ;58(2):814–820.
- Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G. (1997).** Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *Plant Cell.*;9:1767–1780. doi: 10.1105/tpc.9.10.1767.
- Fliniaux M., Manceau F., Jacquin-Dubreuil A. (1993).**Simultaneous analysis of l-hyoscyamine, l-scopolamine and dl-tropic acid in plant material by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 644 :193–197.

- Foliart D.E., Pollock B.H., Mezei G., Iriye R., Silva J.M., Ebi K.L., Kheifets L., Link M.P., Kavet R.(2006).** Magnetic field exposure and long-term survival among children with leukaemia. *Br J Cancer*.94: 161-4.
- Forastiere A.A., Metch B., Schuller D.E., Ensley J.F., Hutchins L.F., Triozzi P., Kish J.A., McClure S., VonFeldt E., Williamson S.K. and VonHoff D.D.(1992).** Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil *versus* methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10: 1245-1251.
- Formigli L. , Papucci L. , Tani A , et al .(2000).**Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis . *J Cell Physiol* . ; 182 (1) : 41 – 49 .
- Frezza M., Garay J., Chen D., Cui C., Turos E., Dou Q.P. (2008).** Induction of tumor cell apoptosis by a novel class of N-thiolated beta-lactam antibiotics with structural modifications at N1 and C3 of the lactam ring. *Int J Mol Med* . ;21(6):689-95.
- Fukai T., Folz R.J., Landmesser U., et al.(2002).**Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*.;55:239–49.
- Fukai T., Siegfried M.R., Ushio-Fukai M., Cheng Y., Kojda G., Harrison DG. (2000).** Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*.;105:1631–9.
- Galluzzi L., Maiuri M. C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. (2007).** Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 14, 1237–1243.
- Gao J. L., Lv G. Y., He B. C., Zhang B. Q., Zhang H., Wang N., Wang C. Z., Du W., Yuan C. S. & He T. C. (2013).** Ginseng saponin metabolite 20(S)-protopanaxadiol inhibits tumor growth by targeting multiple cancer signaling pathways. *Oncol. Rep*. 30(1):292-298.
- Garcia A., Eljack N. D., Sani M. A., Separovic F., Rasmussen H. H., Kopec W., et al. . (2015).** Membrane accessibility of glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1848 : 2430–2436.
- Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P.E., Didelot C., Kroemer G.(2006).** Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*;13:1423–33.
- Gewirtz D.A. (2014).** The four faces of autophagy: Implications for cancer therapy. *Cancer Res*.;73:647–651.
- Gill S.S., Tuteja N.(2010).**Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* . ;5 (1):26-33.
- Gilloteaux J. , Jamison J.M ., Arnold D. , Summers J.L .(2001).** Autoschizis: another cell death for cancer cells induced by oxidative stress . *Ital J Anat Embryol* . ; 106 (2 suppl 1) : 79 – 92
- Gilloteaux J. , Jamison J.M. , Lorimer H.E. , et al .(2004).** Autoschizis: a new form of cell death for human ovarian carcinoma cells following ascorbate: menadione treatment. Nuclear and DNA degradation . *Tissue Cell* ; 36 (3) : 197 – 209 .
- Goulart M.O.F., Sant’Ana A.E.G., Lima R.A., Cavalcante S.H., Carvalho M.G., Braz-Filho R. (1993).** Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. *Quím Nova* ;16: 95-100.

- Goullé J.P., Pépin G., Dumestre T. V., Lacroix C. (2004).** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*.pp :22-35.
- Gray D.L., Warshawsky D., Xue W., Nines R., Wang Y., Yao R., Stoner G.D.(2001).**The effects of a binary mixture of benzo(a)pyrene and 7H-dibenzo(c,g)carbazole on lung tumors and K-ras oncogene mutations in strain A/J mice. *Exp Lung Res.*;27: 245-53.
- Hacker N.F., Eifel P.J., der Velden J.V. (2015).**Cancer of the vagina. International Journal of gynecology obstetrics, , *FIGO Cancer Report* Pages 13: S84–S87.
- Haghiac M. et Walle T.(2005).**Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr Cancer* ; 53 :220–231.
- Hamdi Cherif M., Bidoli E., Birri S., Mahnane A., Zaidi Z., Boukharouba H., Moussaoui H., Kara L., Ayat A., Makhloufi K., Bouchaibi I., Atoui., Virdone S., Serraino D. (2015).** Cancer estimation of incidence and survival in Algeria 2014. *J Cancer Res Ther*, 3(9):100-104
- Han E.H., Kim J.Y., Kim H.G., Choi J.H., Im J.H., Woo, E.R., Jeong H.G. (2010).**Dihydro-N-caffeoyltyramine down-regulates cyclooxygenase-2 expression by inhibiting the activities of C/EBP and AP-1 transcription factors. *Food Chem. Toxicol.* 48 :579–586.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
- Haris M., Mahmood R., Rahman H., Rahman N.(2016).***In vitro* cytotoxic activity of *Clerodendrum infortunatum* L. Against T47D, PC-3, A549 and HCT-116 human cancer cell lines and its phytochemical screening. *Int J Pharm Pharm Sci* ;8:439-44.
- Harvey K. C.(2000).** U.S. Pat. US6017806 ~2000.
- Hassan A., Dahham S.S., Saghir S.A., Mohammed A.M. (2016).** Chemotherapeutic potentials of the stem bark of *Balanite aegyptiaca* (L.) Delile: an antiangiogenic, antitumor and antioxidant agent. *BMC Complement Altern Med* ; 16 (1):396.
- Hassan M., Watari H., and Sakuragi N. (2014).** Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer BioMed Research International Volume 2014 (2014), Article ID 150845, 23 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/150845>
- Hassan M.M., Hwang L.Y., Hatten C.J., Swaim M., Li D., Abbruzzese J.L., Beasley P., Patt Y.Z.(2002).** Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma: Synergism of Alcohol with Viral Hepatitis and Diabetes Mellitus. *Hepatology* ;36: 1206- 13.
- Hecht S.S.(2006).** Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg*;391: 603-13.
- Hecht S.S.(2012).** Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the family smoking prevention and tobacco control act. *Nicotine Tob Res.* 14: 18-28.
- Heerde W.L., Robert-Offerman S., Dumont E., Hofstra L., Doevendans P.A., Smits J.F., et al. (2000).** Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: Focus on Annexin V. *Cardiovasc Res* ; 45:549-59.
- Henry K.D., Williams E. R., Wang B.H., McLafferty F. W., Shabanowitz J., and Hunt D. F. (1989).**Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization *PNAS* , 86 (23) : 9075-9078.

- Herskovic A., Martz K., Sarraf M., Leichman L., Brindle J., Vaitkevicius V., Cooper J., Byhardt R., Davis L. and Emami B (1992).** Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Engl J Med* ;326: 1593-1598.
- Hill B.T,Whelan R.D., Shellard S.A., McClean S., Hosking L.K.(1994)** .Differential cytotoxic effects of docetaxel in a range of mammalian tumor cell lines and certain drug resistant sublines in vitro, *Invest New Drugs.*,12(3):169-82.
- Hill M.M., Adrain C., Duriez P.J., Creagh E.M., Martin S.J.(2004).** Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J.* ; 23:2134–45.
- Ho S.T., Tung Y.T., Cheng K.H., Wu J.H.(2010).** Screening, determination and quantification of major antioxidants from *Balanophora laxiflora* flowers. *Food Chemistry*, 122; 584–588.
- Hollman P.C., Bijlsman M.N., van Gameren Y., Cnossen E.P., de Vries J.H., Katan M.B.(1999).** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* ;31:569–573. doi: 10.1080/10715769900301141.
- Horvitz H.R . (2003).** Worms, life, and death (Nobel lecture) . *ChemBioChem* . ; 4 (8) : 697 – 711 .
- Hsu H. , Xiong J. , Goeddel D.V .(1995).** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation . *Cell* . ; 81 (4) : 495 – 504 .
- Hsu T. H., Chu C. C., Hung M. W., Lee H. J., Hsu H. J. & Chang T. C. (2013).** Caffeic acid phenethyl ester induces E2F-1-mediated growth inhibition and cell-cycle arrest in human cervical cancer cells. *FEBS J.* doi: 10.1111/febs.12242.
- Hsu Y. L., Wu L. Y., Hou M. F., Tsai E. M., Lee J. N., Liang H. L., Jong Y. J., Hung C. H & Kuo PL. (2011).** Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells by inhibiting focal adhesion kinase/Rho signaling pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* 55(2):318-327.
- Huang M., Gao H., Chen Y. Chimmitecan (2007).** A novel 9-substituted camptothecin, with improved anticancer pharmacologic profiles *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Cancer Res*;13(4):1298-307.
- Hussain S.P., Amstad P., Raja K., Sawyer M., Hofseth L., Shields P.G., Hewer A., Phillips D.H., Ryberg D., Haugen A., Harris C.C.(2001).** Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous humanlung. *Cancer Res.*;61: 6350-5.
- Igney F.H., Krammer P.H.(2002).** Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.*Nat Rev Cancer.*;2(4):277-88.
- Iida S., Shimada J and Sakagami H. (2013).** Cytotoxicity Induced by Docetaxel in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines *in vivo*27: 321-332.
- Irena M.,Niezabitowska K., Studziński M., Gadzikowska M. (2013).**Comparison of TLC and Different Micro TLC Techniques in Analysis of Tropane Alkaloids and Their Derivatives Mixture from *Datura Innoxia* Mill. Extract ,*Chromatographia* , 76 (19):1327-1332 .
- Jamison J.M. , Gilloteaux J. , Taper H.S. , Calderon P.B. , Summers J.L .(2002).** Autoschizis: a novel cell death . *Biochem Pharmacol* . ; 63 (10) : 1773 – 1783.

- Jin S., Zhang Q.Y., Kang X.M., Wang J.X., Zhao W.H. (2010).** Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol*, 21:263-268.
- Jin-Jian Lu, Jiao-Lin Bao, Xiu-Ping Chen, Min Huang, and Yi-Tao Wang. (2012).** Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2012. doi:10.1155/2012/485042
- Jouzier E.(2000).** Solanacées medicinales et philatelie Bull. *Soc Pharm Bordeaux*, pp : 144.
- Takehi J., Kuwashiro Y., Niitsu M., Takahashi T.(2008) .** Thermospermine is required for stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 49 :1342–1349
- Kang N.J, Shin S.H., Lee H.J., Lee K.W.(2011).** Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther.*;130(3): 310-24.
- Kaplan M., Register D.C., Bierman A.H., Risacher R.I. (1974).** A nonfatal case of intentional scopolamine poisoning, *Clin. Toxicol*. 7509–512.
- Kaplow R. (2005).** Innovations in antineoplastic therapy. Review. *Nurs Clin North Am* ;40: 77-94.
- Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B, Craig R.W. (1991) .**Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 51: 6304–6311.
- Katsumata N., Noda K., Nozawa S., Kitagawa R., Nishimura R., Yamaguchi S., Aoki D., Susumu N., Kuramoto H., Jobo T., Ueki K., Ueki M., Kohno I., Fujiwara K., Sohda Y. and Eguchi F(2005).** Phase II trial of docetaxel in advanced or metastatic endometrial cancer: A Japanese Cooperative Study. *Br J Cancer* ;93: 999-1004.
- Keller H., Hohlfeld H., Wray V., Hahlbrock K., Scheel D., Strack D. (1996).** Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 42: 389-396.
- Kenkel J. V. (2003).** Analytical Chemistry for Technicians. *Third Edition, Boca Raton, Florida. Corporate Ltd.* pp 310-367.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.(1972).**Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.*Br J Cancer*.;26(4):239-57.
- Keum Y.S., Jeong W.S., Kong A.N.(2004).** Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res* ;555(1-2):191-202.
- Kevin S.C., Allison N.S, Mathew C. F.et al.,(2013).** Nanoparticle Drug Loading as a Design Parameter to Improve Docetaxel Pharmacokinetics and Efficacy , *Biomaterials* ; 34(33): 10.1016/j.biomaterials.2013.07.038.
- Kim B.G., Gao M.Q., Choi Y.P., Kang S., Park H.R .et al.(2012).** Invasive breast cancer induces laminin-332 upregulation and integrin β 4 neoexpression in myofibroblasts to confer an anoikis-resistant phenotype during tissue remodeling. *Breast Cancer Research.*; 14: R88.
- Kim E.H. , Min H.Y. , Chung H.J. , Song J. , Park H.J. , Kim S. , Lee S.K. (2012).** Anti-proliferative activity and suppression of P-glycoprotein by (-)-antofine, a natural phenanthroindolizidine alkaloid, in paclitaxel-resistant human lung cancer cells ,*Food Chem. Toxicol.*, 50 : 1060-1065.

Kim S.R. , Sung S.H. , Kang S.Y. , Koo K.A. , Kim S.H. , Ma C.J.(2004). Aristolactam BII of *Saururus chinensis* attenuates glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures probably by inhibiting nitric oxide production *Planta Med.*, 70 :391-396.

Kim Y. J., Kwon H. C., Ko H., Park J. H., Kim H. Y., Yoo J. H. & Yang H. O. (2008). Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk1 in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 31(5):826-830.

Kim Y.N., Koo K.H., Sung J.Y., Yun U.J., Kim H.(2012). Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *International Journal of Cell Biology*; 11.

Klionsky D.J., Cuervo A.M., Seglen P.O. (2007). Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*;3(3):181-206.

Kroemer G., GMariño G., and Levine B. (2010). Autophagy and the integrated stress response , *Mol Cell.*; 40(2): 280–293.

Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A.F. (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* 2 : 124–130.

Kumar G., Dange P., Kailaje V., Vaidya M.M., Ramchandani A.G., Maru G.B.(2012). Polymeric black tea polyphenols modulate the localization and activity of 12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate-mediated kinases in mouse skin: mechanisms of their anti-tumor-promoting action. *Free Radic Biol Med.* , 15;53(6):1358-70.
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.017.

Kumar R. A., Sridevi K., Vijaya Kumar N., Nanduri S., and Rajagopal S. (2004). Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*, *Journal of Ethnopharmacology*, 92 (3) :291–295.

Kumar S., Sharma V.K.,Yadav S. and Kumar S.D. et al. (2017). Antiproliferative and apoptotic effects of black turtle bean extracts on human breast cancer cell line through extrinsic and intrinsic pathway. *Chem Cent J*;11(1):56.

Kunz M. , Ibrahim S. , Koczan D. , (2001). Activation of c-Jun NH2- terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma . *Cell Growth Differ* ; 12 (3) : 137 – 145

Kuo Y. Y., Lin H. P., Huo C., Su L. C., Yang J., Hsiao P. H., Chiang H. C., Chung C. J., Wang H. D., Chang J. Y., Chen Y. W. & Chuu C. P. (2013). Caffeic acid phenethyl ester suppresses proliferation and survival of TW2.6 human oral cancer cells via inhibition of Akt signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 14(5):8801-8817.

Kuramoto Y., Hata K., Koyanagi S., Ohdo S., Shimeno H. & Soeda S. (2006). Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem. Pharmacol.* 71(8):1155-1161.

Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y.(2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.*;171:4672–9.

Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228 :367–381.

Laneuville P. (2018). When to Stop Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia , *Curr Treat Options Oncol.*; 19(3): 15.

- Lavelle F, Bissery MC, Combeau C, Riou JF, Vrignaud P and Andre S. (1995).** Preclinical evaluation of docetaxel. *Semin Oncol* ;22: 3-16.
- Lee D.G., Park Y., Kim M.R., Jung H.J., Seu Y.B., Hahm K.S., Woo E.R., (2004).** Antifungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnol. Lett.*26 : 1125–1130.
- Lee J. Y., Jung K. H., Morgan M. J., Kang Y. R., Lee H. S., Koo G. B., Hong S. S., Kwon S. W. & Kim Y. S. (2013).** Sensitization of TRAIL-induced cell death by 20(S)-ginsenoside Rg3 via CHOP-mediated DR5 upregulation in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 12(3):274-285.
- Lee M.R. (2006).** Solanaceae III: henbane, hags and Hawley Harvey Crippen. *J R Coll Physicians Edinb*,36:366–373.
- Lee T.J., Kim O.H., Kim Y.H., Lim J.H., Kim S., Park J.W., Kwon T.K.(2006).**Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett.*;240:234–42.
- Leist M. , Jaattela M. (2001).** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms . *Nat Rev .* ; 2 (8) : 589 – 598
- Lenga R.E. et Votoupal K.L. (1993).** The Sigma-Aldrich library of regulatory and safety data. Vol. 1. Milwaukee : Sigma-Aldrich.
- Li H. , Zhou X. , Gao P. , Li Q. , Li H. , Huang R., Wu M. (2016).**Inhibition of lipid oxidation in food and feed materials and hydroxyl radical-induced fish erythrocytes: a comparative study of Ginkgo biloba leaves extracts and synthetic antioxidants *,Anim. Nutr. J.*, [10.1016/j.aninu.2016.04.007](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.04.007)
- Li W., Shao Y., Hu L., Zhang X., Chen Y., Tong L., et al.(2007).** BM6, a new semisynthetic vinca alkaloid, exhibits its potent *in vivo* anti-tumor activities via its high binding affinity for tubulin and improved pharmacokinetic profiles. *J Cancer Biol Ther* ;6(5):787-94.
- Li Y. ,Yao J., Han C.,Yang J., Chaudhry M.T., Wang S., Liu H. and YinY.(2016).** Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* ; 8(3): 167.
- Li Y., Zhang J., Ma H., Chen X., Liu T., Jiao Z., He W., Wang F., Liu X. & Zeng X. (2013).** Protective role of autophagy in matrine-induced gastric cancer cell death. *Int. J. Oncol.* 42(4):1417-1426.
- Liao X., Zhou X., Mak N.K., and Leung K.(2013).** Tryptanthrin Inhibits Angiogenesis by Targeting the VEGFR2-Mediated ERK1/2 Signalling Pathway , *PLoS One.* ; 8(12): e82294.
- Lin H. P., Lin C. Y., Liu C. C., Su L. C., Huo C., Kuo Y. Y., Tseng J. C., Hsu J. M., Chen C. K. &Chuu C. P. (2013).** Caffeic acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akt signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 14(3):5264-5283.
- Lindsten T.,Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell J.C., Shiels, H.A., Ulrich E., Waymire K.G., Mahar P., Frauwirth K., et al. (2000).** The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* , 6 :1389–1399.
- Litz R.J., Popp M., Stehr S.N, Koch T. (2006).** Anaesthesia. 61:800-1.

- Liu X., Sun J., Chen X., Wang S., Scott H., Zhang X. & Zhang Q. (2012).** Pharmacokinetics, tissue distribution and anti-tumour efficacy of paclitaxel delivered by polyvinylpyrrolidone solid dispersion. *J. Pharm. Pharmacol.* 64(6):775-782.
- Liu Y., Xie S., Wang Y., Luo K., Wang Y. & Cai Y. (2012).** Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. *Molecules* 17(6):7206-7216.
- Llambi F., Green D.R. (2011).** Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21 : 12–20.
- Lorence A, Medina-Bolivar F., Nessler CL.(2004).** Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots , *Plant Cell Rep.*;22(6):437-41.
- Loubaki B.C., Ouattara A.S., Ouattara C.A.T., Ouédraogo/Traoré R., Traoré A.S., (1999).** Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [Cesalpinaceae (Guill. et Perr.)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies au Burkina Faso. *Rev. CAMES - Sciences et Médecine*, 01: 66-73.
- Lu J.J., Bao J.L., Chen X.P., Huang M., Wang Y.T.(2012).** Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evid Based Complement Alternat Med*;20(12):12.
- Mahmood U., Yogendra S., Raghunath S., Thakur R. (2001).** 2,3-dimethylnonacosane and tropane alkaloids from *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*;24 (7):1618-1619.
- Majno G. and Joris I. (1995).** Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15.
- Manfredi J., and Horowitz S. (1984).** Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* ;25:83–125.
- Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J.(2005).** Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22: 355–370.
- Mata R., Morales I., Perez O., Rivero-Cruz I., Acevedo L., Enriquez-Mendoza I., Bye R., Franzblau S., Timmermann B.,(2004).** Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *J. Nat. Prod.*67 : 1961–1968.
- Materska M. (2008).** Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-Review. *Pol J Food Nutr Sci.* ; 58:407–413.
- Matsubara K., Ishihara K., Mizushima Y., Mori M., Nakajima N.(2004).** Anti-Angiogenic Activity of Quercetin and its Derivatives ,*Letters in Drug Design & Discovery* ;1 (4) :122-145.
- Mena P., Calani L., Dall'Asta C., Galaverna G., García-Viguera C., Bruni R., Crozier A., Del Rio D.(2012).** Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. *Molecules.* 13;17(12):14821-40. doi: 10.3390/molecules171214821.
- Mena,S.;Rodríguez,M.L.;Ponsoda,X.;Estrela,J.M.;Jaättela,M.;Ortega,A.L (2012).** Pterostilbene-Induced Tumor Cytotoxicity: A Lysosomal Membrane Permeabilization-Dependent Mechanism. *PLoS One*, 7 (9), e44524.
- Mentzer J.T., Foggin J.H., Golicic S.L. (2000).** Collaboration: the enablers, impediments, and benefits. *Supply Chain Management Review*, 5 (6) :52-58.

Mertens-Talcott S. U. et Percival S. S. (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* ; 218 :141–151.

Mertens-Talcott S. U., Talcott S. T. & Percival S. S.(2003). Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *J Nutr* 133 :2669–2674.

Michael N Gould (1997). Cancer Chemoprevention and Therapy by Monoterpenes *Environmental Health - Environ Health Perspect.*;(4):977-9.

Miller-Fleming L., Sandoval V.O., Campbell K., Ralser M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21): 3389-3406.

Minguet E.G., Vera-Sirera F., Marina A., Carbonell J., Blazquez M.A. (2008). Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* 25 :2119–2128.

Miraldi E., Masti A., Ferri S., Comparini I.B., (2001). Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*, *Fitoterapia* ; 72 644–648.

Mladinic M., Zeljezic D., Shaposhnikov S.A., Collins A.R.(2012). The use of FISHcomet to detect c-myc and Tp53 damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicol Lett.*;211: 62-9.

Mordukhovich I., Rossner P.J., Terry M.B., Santella R., Zhang Y.J., Hibshoosh H., Memeo L., Mansukhani M., Long C.M., Garbowski G., Agrawal M., Gaudet M.M., Steck S.E., Sagiv S.K., Eng S.M., Teitelbaum S.L., Neugut A.I., Conway-Dorsey K., Gammon M.D.(2010). Associations between polycyclic aromatic hydrocarbon-related exposures and p53 mutations in breast tumors. *Environ Health Perspect.*; 118: 511-8.

Mosmann T., (1983). “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63.

Muhlenbeck U., Kortenbusch A., Barz W. (1996). Formation of hydroxycinnamoyl amides and alpha-hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*. *Phytochemistry* , 42: 1573-1579.

Muro K., Hamaguchi A. and Ohtsu N. (2004). A phase II study of single agent docetaxel in patients with metastatic esophageal cancer. *Annals Oncol* ;15: 955-959.

N’Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traore D., Akéassi L. ,(2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d’Ivoire). *Sciences & Nature* ,6 (1), 1-15.

Nair S., Xu C., Shen G., Hebbar V., Gopalakrishnan A., Hu R. (2006). Pharmacogenomics of phenolic antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA) in the small intestine and liver of Nrf2 knockout and C57BL/6J mice. *Pharm Res.*;23:2621–2637.

Nair S.; Li W.; Kong A.-N. T. (2007). Natural Dietary Anti-Cancer Chemopreventive Compounds: Redox-Mediated Differential Signaling Mechanisms in Cytoprotection of Normal Cells versus Cytotoxicity in Tumor Cells. *Acta Pharmacol. Sin.*28 (4), 459–472.

Nakatogawa H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* , 10, 458–467.

- Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y.(2009).** Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev.Mol. Cell Biol.* 10, 458–467.
- Namera A., Yashiki M., Hirose Y., Yamaji S., Tani T., Komija T., (2002).** Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* ;130 34–43.
- Naomichi F., Michiko Y. and Takeatsu K.(1983).**Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. IN-trans and Ncis-Feruloyl tyramine and a new phenolic glucoside, Tino-tuberide. *Chem.Pharm.Bull* ; 31,156–161.
- Negrel J., Pollet B., Lapierre C. (1996).** Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry* 43: 1195-1199
- Newmeyer D.D., Bossy-Wetzel E., Kluck R.M., Wolf B.B., Beere H.M., Green D.R.(2000).** Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ.* ;7:402–7.
- Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E. (1998).** Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* ; 102-103 : 139 – 142 .
- Nogue S., Pujol L. (1995).** *Datura stramonium* poisoning. Identification of tropane alkaloids in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Int. Med. Res.* 23 :132–137.
- Nunez R. (2001).** DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3, 67–70.
- Oschou P. N., Paschalidis K. A., Delis I. D., Andriopoulou A. H., Lagiotis G. D., Yakoumakis D. I., et al. (2008).** Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* ; 20 : 1708–1724.
- Oshima T., Sagara K., Tong Y.Y., Chen Y.H. (1989).** Application of ion-pair high performance liquid chromatography for analysis of hyoscyamine and scopolamine in solanaceous crude drugs, *Chem. Pharm. Bull.* 37 : 2456–2458.
- Park J. (2007).** Caffeodymine from cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selection. *J. Agric. Food. Chem.* 55 : 2171–2175
- Park J.B., Schoene N. (2002).** Synthesis and characterization of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 :1104–1110.
- Park M.H.(2006).** The post-translational synthesis of a polyamine-dependent amino acid hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J. Biochem. (Tokyo)* 139 : 161–169.
- Park S., Kang K., Kim Y.S., Back K., (2009).** Endosperm-specific expression of tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase and tyrosine decarboxylase from a single self-processing polypeptide produces high levels of tyramine derivatives in rice seeds. *Biotechnol. Lett.* 31, 911–915.
- Park S., Kang K., Lee K., Choi D., Kim Y.S., Back K., (2009).** Induction of serotonin biosynthesis is uncoupled from the coordinated induction of tryptophan biosynthesis in pepper fruits (*Capsicum annuum*) upon pathogen infection. *Planta* 230 : 1197–1206.
- Parng C., Anderson N., Ton C., McGrath P.(2004).** Zebrafish Apoptosis Assays for Drug Discovery. *Methods in Cell Biology*; 76:75-85.

- Petrovsky A., Schellenberger E., Josephson L., Weissleder R and Bogdanov A.Jr. (2003).** Near-Infrared Fluorescent Imaging of Tumor Apoptosis, *Cancer research*, 63 : 1936–1942.
- Philipov S., Berkov S.(2002).** GC-MS investigation of tropane alkaloids in *Datura stramonium*, *Zeit. Naturforsch.* 57:559–561.
- Picard J., Meek T. (2006).** *Anesthesia.* 61:107-9.
- Pierzyńska-Mach A., Janowski P.A., Dobrucki J.W. (2014).** Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry A.* ;85(8):729-37.
- Plasencia C., Dayam R., Wang Q. et al. (2005).** Discovery and preclinical evaluation of a novel class of small-molecule compounds in hormone-dependent and -independent cancer cell lines, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(7) : 1105–1113.
- Pratima H. et Mthad M. (2011).** Pharmacognostic Evaluation and Phytochemical Analysis of Leaves of *Cajanus cajan* L. J. *Adv. Dev. Res.* 2(2): 181-185.
- Puri M. (2017).** Food Bioactives Bioactive and Biotechnology applications, *Springer* :122-144.
- Quetin-Leclercq J. (2002).** Le Voyage Insolite De La Plante Au Médicament *Journal de Pharmacie de Belgique*, 57 :11-20.
- Quézel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'algérie et des régions désertiques méridionales. vol.2 *CNRS. Paris.* P: 824.
- Raisch D.W., Campbell W., Garg V., Qureshi ZP., Bookstaver P.B., Norris and Bennett C.L. (2011).** Description of anaphylactic reactions to paclitaxel and docetaxel reported to the FDA, with a focus on the role of premedication. *Expert Opin Drug Saf* ;10: 521-528.
- Randi A.S., Hernandez S., Alvarez L., Sanchez M., Schwarcz M., Kleimand Pisarev D.L. (2003).** Hexachlorobenzene-induced early changes in ornithine decarboxylase and protein tyrosine kinase activities, polyamines and c-myc, c-fos and c-jun proto-oncogenes in rat liver. *Toxicol Sci.*; 76: 291-8.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J (2007).** Ch. Rang and Dale's Pharmacology, *Elsevier Churchill Livingstone.* pp. 153.
- Renouard S., Lopez T., Hendrawati O., Dupre P., Doussot J., Falguieres A., Ferroud C., Hagege D., Lamblin F., Laine E. & Hano C. (2011).** Podophyllotoxin and deoxypodophyllotoxin in *Juniperus bermudiana* and 12 other *Juniperus* species: Optimization of extraction, method validation, and quantification. *J. Agric. Food Chem.* 59(15):8101- 8107.
- Riccardi C., Nicoletti I.(2006).** Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* ;1(3):1458-61.
- Rieger A. M., Nelson K. L., Konowalchuk J. D., and Barreda D. R. (2011).** Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death, *Journal of Visualized Exp* 24;(50). pii: 2597. doi: 10.3791/2597.
- Robbins E, Phillip I, Marcus PI.(1963).** Dynamics of Acridine Orange-Cell Interaction/ *The Journal of cell biology*;18:237–50.
- Robert S, Holzman MD, (1998).** The Legacy of Atropos. *Anesthesiology.* 89 (1): 241–249.

- Rodgman A et Perfetti T.(2009).** The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Boca Raton, FL: CRC Press,Pp. 1483-784.
- Rosenblatt M.A., Abel M., Fischer G.W., Itzkovich C.J., Eisenkraft J.B. (2006).** Anesthesiology. 105:217-8.
- Ross J.A., Kasum C.M.(2002).** Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.*;22:19–34. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957.
- Ruf S., Karcher D., Bock R. (2007).** Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 6998-7002.
- Russo M., Spagnuolo C., Tedesco I., Bilotto S., Russo G.L. (2011).** The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol.* 1;83(1):6-15.
- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., Van Gurp M., van Loo G, Vandenabeele P.(2004).** Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*;23:2861–74.
- Saikali M., Ghantous A., Halawi R., Talhouk S.N., Saliba N.A. and Darwiche N. (2012).** Sesquiterpene lactones isolated from indigenous Middle Eastern plants inhibit tumor promoter-induced transformation of JB6 cells *BMC Complementary and Alternative Medicine* ,12:89.
- Saikumar P. and M.A. Venkatachalam (2009).** Apoptosis and Cell Death.Basic Concepts of Molecular Pathology, *Molecular Pathology Library* 2, 29 DOI: 10.1007/978-0-387-89626-7_4
- Saleh M.R., Al-Ataby S.M., Al-Samarray Y.S.(2015).** The cytotoxicity effect of ethanolic crude extract of *Cnicus benedictus* L. leaves on the murine mammary adenocarcinoma cell line AMN-3. *Iraqi J Cancer Med Genet* ; 8(1):72-8.
- Sarker S., Bartholomew B., Nash R.(2000).** Alkaloids from *Balanites aegyptiaca*. *Fitoterapia* ;71(3):328–30.
- Sarkissian T., Timmons A., White K. et al., (2014).** Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. *Methods*, 15; 68(1): 89–96.
- Savill J., Fadok V. (2000).** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.*;407:78-48.
- Sayers T.J. (2011)** Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 60; 1173–1180.
- Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H., Peter M.E.(1999).** The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* ; 274:1541–8.
- Schneider D. , Gerhardt E. , Bock J. , et al .(2004).** Intracellular acidification by inhibition of the Na + /H + -exchanger leads to caspaseindependent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis . *Cell Death Differ* . ; 11 (7) : 760 – 770 .
- Schrijvers D., Van Herpen C., Kerger J., Joosens E., Van Laer C., Awada A., Van den Weyngaert D., Nguyen H., Le Boudier C., Castelijns J.A., Kaandera J., De Mulder P. and Vermorken J.B.(2004).** Docetaxel, cisplatin and 5- fluorouracil in patients with locally advanced unresectable head and neck cancer: A phase I-II feasibility study. *Ann Oncol* ;15: 638-645 .
- Senthilkumar K. et al. (2010).** Quercetin regulates insulin like growth factor signaling and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in androgen independent prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem* 344 :173–184.

- Shah V.V.; Shah N.D. & Shinde S.S. (2012).** Solanaceae: Historical Aspects. *Inter. J. Pharm. Res. Biosci.* 1(3): 90 - 95.
- Sharma R., Chandan G., Chahal A., Saini R.V. (2017).** Antioxidant and anticancer activity of methanolic extract from *Stephania elegans*. *Int J Pharm Pharm Sci* ;9(2):245-9.
- Shen K. T., Chen M. H., Chan H. Y., Jeng J. H. & Wang Y. J. (2009).** Inhibitory effects of chito-oligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem. Toxicol.* 47(8):1864-71. doi: 10.1016/j.fct.2009.04.044.
- Shimada T., Fujii-Kuriyama Y. (2004).** Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* ;95: 1-6.
- Shimizu S. (2018).** Biological Roles of Alternative Autophagy Biological Roles of Alternative Autophagy *Mol. Cells* ; 41(1): 50-54.
- Shimizu S. , Yoshida T., Tsujioka M. and Arakawa S. (2014).** Autophagic Cell Death and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 3145-3153.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., Mahon M.J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenny S., Boyd M.R.(2003).** New colorimetric cytotoxicity assay for anti cancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.*, 82: 1107-1112.
- Spreij T.E (1771).** Cell death during the development of the imaginal disks of *Calliphora erythrocephala*. *Netherlands Journal of Zoology*; 21:221–264.
- Staton C.A., Brown N.J., Reed M.W. (2009).** Current status and future prospects for anti-angiogenic therapies in cancer. *Expert Opin Drug Discov.*;4(9):961-79.
- Stephenson J., Churchill J.M. (1834).** Medical botany. *Plants in cardiology London*: Myocardial bridges: morphological and functional aspects, volume 1, plate 1.
- Sticht G., Kaferstein H., Staak M., (1989).** Results of toxicological investigations of poisonings with atropine and scopolamine, *Acta Med. Legal. Social.* 39 441–447.
- Stierle A., Strobel G., and Stierle D. (1993)** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* ;260:214–216.
- Sun C.A., Wu D.M., Lin C.C., Lu S.N., You S.L., Wang L.Y., Wu M.H., Chen C.J.(2003).** Incidence and Cofactors of Hepatitis C Virus related Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study of 12,008 Men in Taiwan. *Am J Epidemiol.*;157: 674-82.
- Sun J., Song Y.L., Zhang J.(2015).** Characterization and quantitative analysis of Phenylpropanoid amides in eggplant (*Solanum melongena* L.) by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and hybrid ion trap time of flight mass spectrometry, *J Agric Food Chem*, 63 (13) :3426-3436.
- Sun L., Sun S., Cheng A., Wu X., Zhang Y., Lou H.(2009).** *In vitro* activities of retigeric acid B alone and in combination with azole antifungal agents against *Candida albicans* *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1586– 1591.
- Sun S.Y. (2011).** Understanding the role of the death receptor 5/ FADD/caspase-8 death signaling in cancer metastasis. *Mol. Cell. Pharmacol.* 3:31–34.
- Sun Y., Xun K., Wang Y., Chen X. (2009).** A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs. *Anticancer Drugs*;20(9):757-69.

- Swamy J., Annamma P.S., Chandra Mohan K. & Rasingam L. (2015).** *Hyoscyamus albus* (Solanaceae): A new distributional record for India. *Rheedea* 25(1): 54-56.
- Syu W.J., Don M.J., Lee G.H., Sun C.M. (2001).** Cytotoxic and novel compounds from *Solanum indicum*. *J Nat Prod* 64: 1232-1233
- Szeliga J et Dipple A.(1998).** DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocar-bon dihydrodiol epoxides. *Chem Res Toxicol.*;11: 1-11.
- Szumilak M., Galdyszynska M., Dominska K., Stanczak K., Piastowska-Ciesielska A.W.(2017).** Anticancer activity of some polyamine derivatives on human prostate and breast cancer cell lines.*Acta Biochim Pol.*; 64(2):307-313.
- Talcott J.A. (2003).** Quality of care in prostate cancer: important to start and too important to stop here. *J Clin Oncol*; 21: 1902–1903.
- Tang X. P., Tang G. D., Fang C. Y., Liang Z. H. & Zhang L. Y. (2013).** Effects of ginsenoside Rh2 on growth and migration of pancreatic cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 19(10):1582-1592.
- Tang Y.Q., Jaganath I. B., and Sekaran S. D. (2015).** *Phyllanthus spp.* induces selective growth inhibition of PC-3 and mewo human cancer cells through modulation of cell cycle and induction of apoptosis.*Plos one* ; 5 (9) : 1-11..
- Thangnipon W., Puangmalai N., Chinchalongporn V., Jantrachotechatchawan C., Kitiyanant N., Soi-Ampornkul R., Tuchinda P., Nobsathian S. (2013).** N-benzylcinnamide protects rat cultured cortical neurons from β -amyloid peptide-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* ,556:20-25.
- The Merck Index on CD ROM (1997).**, Version 12:2,
- Tian Q. E., De Li H., Yan M., Cai H. L., Tan Q. Y. & Zhang W. Y. (2012).** Effects of Astragalus polysaccharides on P-glycoprotein efflux pump function and protein expression in H22 hepatoma cells *in vitro*. *BMC Compl. Altern. Med.* 12:94.
- Tiwari P. and Kakkar H.P.A.(1990).** Phytochemical examination of *Spilanthes acemella* (Murr.). *Journal of the Indian Chemical Society*, 67 (9):784–785.
- Tor Y. S., Yazan L. S., Foo J. B. et al., (2014).** Induction of apoptosis through oxidative stress-related pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa*, *BMC Complement Altern Med.*;14(55) : 1-12.
- Treas G. E et Evans W.C. (1983).** *Pharmacognosy, 12 th Ed. Bailliers and Tindall. London*, pp: 45-47.
- Tsujimoto Y. (2003).**Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J. Cell. Physiol.* 195:158–167.
- Turnock J., Cowan S., Watson A., Bartholomew B., Bright C., Latif Z., Sarker S.D., Nash R.J. (2001).** N-trans-feruloyltyramine from 2 species of the Solanaceae. *Biochem Syst Ecol*; 29: 209-211.
- Unchern S., Saito H., Nishiyama N. (1997).** Selective cytotoxicity of piperine on cultured rat hippocampal neurons in comparison with cultured astrocytes: The possible involvement of lipid peroxidation. *Biol Pharm Bull* ;20(9):958-61.

- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(1): 44–84.
- Van de Loosdrecht A.A., Beelen R.H., Ossenkoppele G.J., Broekhoven M.G., Langenhuijsen M.M.(1994).** A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*. 14;174(1-2):311-20.
- Verhoven B., Krahling S., Schlegel R.A., Williamson P.(1999).** Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ*;6:262-70.
- Vermes I. and Haanen C.(1994).** Apoptosis and Programmed Cell Death in Health and Disease *Advances in Clinical Chemistry* ;31 : 177-246.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A. (1995).** novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* ;184:39-52.
- Vishal Vilas Shah., Nutan Dhanpal Shah., Prasad Vasantrao Patrekar. (2013).** Medicinal Plants from Solanaceae Family. *Research J. Pharm. and Tech.* 6(2):22-30.
- Wajant H. (2002).** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* ;296:1635–6.
- Wakeford R.(2004).** The cancer epidemiology of radiation. *Oncogene*;23: 6404-28.
- Wang L.M., Ren D.M. (2010).** Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor: recent advances in combination chemotherapy. *Mini Rev Med Chem* ,10:1058–1070.
- Wang W., Rayburn E. R., Hao M., Zhao Y., Hill D. L., Zhang R. & Wang H. (2008).** Experimental therapy of prostate cancer with novel natural product anti-cancer ginsenosides. *Prostate* 68(8):809-819.
- Weerasinghe P. and Buja L.M. (2012).** Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp. Mol. Pathol.*, 93: 302-308.
- Wei M.C., Zong, W.X. ,Cheng, E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V.; Ross A.J.; Roth K.A.; MacGregor G.R.; Thompson C.B.; Korsmeyer S.J. (2001).** Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* , 292: 727–730.
- Weinberg G., Ripper R., Feinstein D.L., Hoffman W. (2003).** Regional Anesthesia and *Pain Medicine*. 28: 198-202.
- Weinberg G.L., VadeBoncouer T., Ramaraju G.A., Garcia-Amaro M.F., Cwik M.J., (1998)** *Anesthesiology*. 88: 1071-5.
- Wen Q., Fan T., Bai S., Sui Y. (2015).** Cytotoxicity of proparacaine to human corneal endothelial cells *in vitro* ,40 (4) :427-436.
- Wen X., Lin Z.Q., Liu B., Wei Y.Q (2012).** Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 45, 217–224.
- White K., Grether M.E., Abrams J.M., Young L., Farrell K., Steller H.(1994) .** Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*;264 (5159):677–683.

- Wilhelm S.M., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet J.M., Lynch M.(2008).** Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther.*;7(10):3129–40.
- Wlodkowic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z.(2010).** Cytometry in cell necrobiology revisited. Recent advances and new vistas. *Cytometry A* ;77A:591–606.
- Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z.(2011).** Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death , *Methods Cell Biol.* ;103:55-98.
- Wong P.S., Matsumura F. (2007).** Promotion of breast cancer by beta-hexachlorocyclohexane in MCF10AT1 cells and MMTV-neu mice. *BMC Cancer*; 7: 130.
- Wu Q. , Kirschmeier P. , Hockenberry T. , et al .(2002).** Transcriptional regulation during p21WAF1/CIP1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells . *J Biol Chem.* ; 277 (39) : 36329 – 36337 .
- Wyatt D.K., Richardson W.G., McEwan B., Woodside J.M., Grady L.T., (1976).** GLC assay of belladonna extracts, *J. Pharm. Sci.* 65 680–684.
- Wyllie A. H., Kerr J. F. R., and Currie A. R. (1980).** Cell death: the significance of apoptosis,” *International Review of Cytology*, 68 :251–306.
- Wyllie A.H. (1997).**Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.* 53:451–465.
- Xiao X. Y., Hao M., Yang X. Y., Ba Q., Li M., Ni S. J., Wang L. S. & Du X. (2011).** Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Lett.* 302(1):69-75.
- Xu Z., Chen X., Fu S., Bao J., Dang Y., Huang M., Chen L. & Wang Y. (2012).** Dehydrocorydaline inhibits breast cancer cells proliferation by inducing apoptosis in MCF-7 cells. *Am. J. Chin. Med.* 40(1):177-185.
- Xu Z., Chen X., Zhong Z., Chen L. & Wang Y. (2011).** Ganoderma lucidum polysaccharides: Immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am. J. Chin. Med.* 39(1):15-27.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.(1995).** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.*;80:285–91.
- Yared J.A. and Tkaczuk B.(2012).** Update of taxane development: New analogues and new formulations. *Drug Des Devel Ther*6: 371- 384.
- Yokozawa T.,Tanaka T.,and Kimura T.(2001).** Examination of thenitricoxide production-suppressing componentin *Tinospora tuberculata* .*Biol.Pharm.Bull.* 24,1153–1156.doi:10.1248/bpb.24.1153
- Yokozawa T.,Wang T.S.,Chen C.P.,and Hattori M.(2000).**Inhibition of nitric oxide release by an aqueous extractof *Tinospora tuberculata*.*Phytother.Res.* 14, 51–53.
- Yu J. , Vodyanik M.A. , Smuga-Otto K. , Antosiewicz Bourget J. , Frane J.L. , Tian S. , Nie J. , Jonsdottir G.A. , Ruotti V. , Stewart R. , et al.(2007).** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells , *Science*, 318 : 1917-1920
- Yu J., Wang Z., Kinzler K.W., Vogelstein B., Zhang L (2003).** PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1931–1936.

- Yu S., Kong A.N.(2007).** Targeting carcinogen metabolism by dietary cancer preventive compounds. *Curr Cancer Drug Targets* ;7(5):416-24.
- Yu Y.,Tan S., Zhao S.,Zhuang X., Song Q., Wang Y., Zhou Q., and Zhang Z.(2013).**Antitumor activity of docetaxel-loaded polymeric nanoparticles fabricated by Shirasu porous glass membrane-emulsification technique. *Int J Nanomedicine* ; 8: 2641–2652.
- Yun U. J., Lee J. H., Koo K. H., Ye S. K., Kim S. Y., Lee C. H. & Kim Y. N. (2013).** Lipid raft modulation by Rp1 reverses multidrug resistance via inactivating MDR-1 and Src inhibition. *Biochem. Pharmacol.* (10):1441-1453.
- Zhang F.Y., Du G.J., Zhang L., Zhang C.L., Lu W.L., Liang W. (2009).**Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein. *Pharm Res* ; 26(4):914-25.
- Zhang H. et al.(2012).**Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 50 :1589–1599.
- Zhang Y., But P. P., Ooi V. E., Xu H. X., Delaney G. D., Lee S. H. & Lee S. F. (2007).** Chemical properties, mode of action, and in vivo antiherpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 75(3):242-249.
- Zhang Z., Du G. J., Wang C. Z., Wen X. D., Calway T., Li Z., He T. C., Du W., Bissonnette M., Musch M. W., Chang E. B. & Yuan C. S. (2013).** Compound K, a ginsenoside metabolite, inhibits colon cancer growth via multiple pathways including p53-p21 interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 14(2):2980-2995.
- Zhang, Q., Zhao, X. H. & Wang, Z. J.(2008).** Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol* ; 46 : 2042–2053.
- Zhao D., Qin C., Fan X., Li Y., Gu B.(2013).** Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol* ;15 (7) : 723:360.
- Zhi-yun Z., Ming L.A., D'Arcy W.G.(1994).** SOLANACEAE. *Flora of China* 17: 300–332.
- Zhou H., Sun X., Zhang L., et al. (2012).** Fabrication of biopolymeric complex coacervation core micelles for efficient tea polyphenol delivery via a green process. *Langmuir*, 28:14553–61.
- Zhou Q. M., Wang S., Zhang H., Lu Y. Y., Wang X. F., Motoo Y. & Su S. B. (2009).** The combination of baicalin and baicalein enhances apoptosis via the ERK/p38 MAPK pathway in human breast cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 30(12):1648-1658.
- Zong W.X. , Ditsworth D. , Bauer D.E. , Wang Z.Q., Thompson C.B . (2004).** Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death . *Genes Dev* . ; 18 (11) : 1272 – 1282 .
- Zong W.X., Thompson C.B.(2006).** Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*; 20:1–15.

Investigation of the Molecular Mechanisms of Induction of Cytotoxicity of the Methanolic Extract of the Plant: *Hyoscyamus albus L*

Abstract

Hyoscyamus albus is a plant belonging to the Solanaceae family, generally used in traditional medicine as a nervous sedative and para sympatholytic which is rich source of flavonoids, alkaloids. Our aim is to identify the active products and to evaluate the cytotoxic activity of the aerial parts of *H. albus* collected from the regions of Aures-Algeria.

Phytochemical screening revealed that HAMEOH is rich in alkaloids, terpenoids more than tannins and polyphenols. The phytochemical study was carried out starting with the extraction with solvents with increasing polarity then purification of the methanolic extract on column of Sephadex LH-20 gel, then TLC and separation of the compounds by preparative HPLC, control of purification by analytical HPLC, analysis with mass spectrometry and finally identification using proton NMR, carbon 13 and two-dimensional NMR.

These analyzes revealed that the methanolic extract of this plant contains products, these were compared with the literature and we identified for the first time from the plant: quercetin-3-D-glucopyranosyl- (1→ 6) BD-glucopyranoside (Ph-FF). N-trans-Feruloyltyramine (FF-P3) and N1 - (hydro) caffeoyl-N8 - (hydro) caffeoylspermidine (FCP01).

The antiproliferative and apoptotic potential of fractions C, D, E, F, G from the methanolic extract on prostate cancer cell lines (DU-145), (PC-3) and (LNCaP) and cell lines human cancerous glioblastoma (U-87 MG) and (U-373 MG) by the MTT test. Fraction C was more active than the other fractions inducing the 50% inhibition of growth in almost all the cell lines tested. In fact, we observed that the extract C had an IC₅₀ equal to 73 mg / ml on DU-145, 187 mg / ml on PC-3, 96 mg / ml on U-87 MG and 114 mg / ml on U-373 MG which were significantly ($P \leq 0.0001$) lower than that induced by the other fractions. Fraction G showed notable activity against DU-145, LNCaP and U-373MG.

The acridine orange apoptosis labeling of fraction C on line PC-3 and cells DU-145 revealed the presence of yellow dots in the base of the nucleus which shows the condensation of chromatin in the nucleus and its fragmentation, as well as the budding of the cytoplasm which confirms the appearance of a cell in apoptosis.

Regarding the cytotoxic activity of the pure products, the product FC P01 was significantly ($P \leq 0.0001$) more active than FC P02 and FC P03 and induced an inhibition of cell growth with an IC₅₀ equal to 156 μ M on DU-145 and 221 μ M on LN-229. Cell viability data also demonstrated that only MG U- 87 cells responded to Ph FF treatment, with a significantly reduced IC₅₀ 58 μ M.

We have evaluated the proliferative inhibition of a chemotherapeutic drug, docetaxel, widely used in clinical practice on a few cell lines such as DU-145, LN-229 and U-2 OS, and this drug has shown better results.

The induction of apoptosis by P01 FC and Ph FF was monitored by flow cytometry using double labeling of LN-229 cells with Annexin V and PI with FACS. After 48 hours of treatment, we found that the different treatments did not induce late apoptosis or necrosis in LN-229 cells. In contrast, FC P01 induced early apoptosis in 14.48% of cells compared to DMSO (9.63%), and Ph FF (3.35%) and untreated control (6.96%). The FC P01 product was found to be more active than PhFF because it exhibits very early and very late apoptosis compared to Ph FF ($P \leq 0.0001$).

Key words: *Hyoscyamus albus*, cytotoxicity, proton NMR, mass spectrometry, flow cytometry, cell lines.

”التحقيق في الاليات الجزئية لتحريض سمية المستخلص الميثيلي لنبات البنج الأبيض ل

المخلص

إن الجزئيات ذات المصدر الطبيعي والتي تمتلك قوة تثبيط نمو وانتشار الخلايا السرطانية عن طريق تفعيل عدة آليات جزئية يجعلها مصدر العديد من الأبحاث والدراسات.

البنج الأبيض هو نبات من فصيلة الباذنجانيات، تستعمل عادة في الطب التقليدي كمهدأ عصبي ومخدر، ان الهدف من دراستنا هو إكتشاف جزئيات نشطة ودراسة نشاطها الخلوي من المنطقة الهوائية لنبات الابيض المجموعه من منطقة الأوراس بالجزائر.

لقد أظهر التحليل الكيميائي ان النبتة غنية بالفلويدات و التربنويد بالاطافة الى العفصيات و البوليفينول، الدراسة الكيميائية بدأت بالاستخلاص عن طريق مذيبات ذات قطبية متزايدة ثم تصفية المستخلص الميثيلي عن طريق عمود هلام السيفاداكس ل ٢٠٥ وقد اسفر عن إستخراج خمس فئات G،F،E،D،C

إن فعالية الفئات الميثيلية G،F،E،D،C المستخلصة المضادة للخلايا السرطانية قد تمت دراستها على عدة خلايا سرطانية متنوعة منها خلايا (145-DU) (3-PC)، (LnCAP) و الخلايا السرطانية الليمفاوية ٦ (mg 87-U) و (mg 373-U) عن طريق تقنية فحص السمية ، وقد تبين أن الفئة س هي الأكثر نشاطا مقارنة بالفئات الأخرى بتأثير ٥٠٪ لتثبيط تمايز الخلايا في كامل الخطوط الخلوية ، في الحقيقة لقد لاحظنا ان المحلول C قد بلغ التركيز المميت لديه بعدة تركيزات هي ٧٣ مغ/مل على (145-DU) ، ١٨٧ مغ/مل على (3-PC) ، ٩٦ مغ/مل (mg 87-U) و ١١٤ مغ/مل على (mg 373-U) ، اظهرت الفئة ج نتيجة معتبرة ضد (145-DU) و (mg 373-U) إن التأثير الإبتدائي للموت الخلوي المبرمج قد تم عن طريق الاكريدن البرتقالي الخاص بالفئة C على الخلايا (3-PC) وقد أظهر تواجد نقاط برتقالية على مستوى النواة وهو ما يوضح تراكم الكروماتين في النواة وتفككها فضلا عن تبرع الميتوبلازم وهذا ما يؤكد الحالة المورفولوجية خلوية في عملية موت مبرمج.

الفئات F و C قد تم دراستهما بسبب الفعالية التي اثبتاها اتجاه الخلايا السرطانية و قد تم تحديد مكوناتهما النشطة عن طريق استعمال تقنيات كرماتوغرافيا رقيقة الطبقة و الإستشراب السائلي عالي الأداء ثم المعاينة عن طريق مطيافية الكتلة وأخيرا التحديد عن طريق الرنين المغناطيسي النووي البروتوني و الكربوني وثنائي الأبعاد ، هذا التحليل قد اثمر عن إيجاد عدة جزئيات هي الكارستين -د-، غليكوبيرانوزيل-١-٦-ب-د-، غليكوبيرانوزيد ، ن-ترانس-فريوبلتييرامين ، ن-(هيدو) كافويل -ن-٨-هيدرو-كافويليسبارميدين و الاثروبين .

بخصوص دراسة فعالية الجزئيات المفصولة قمنا باختيار السمية MTT، الجزئية FC01 كانت اكثر فعالية من FC02 ، FC03 بتقدير (0.0001) وقد احدثت تثبيط التمايز بعدة تراكيز مختلفة ب IC50 يساوي ١٥٦.١56 μM على DU_145 و UM221 على LN_223. معطيات حيوية الخلية قد بينت ان نقط خلايا MGU_87 تتفاعل بعد معالجتها بجزئية PHFF ب IC50 يقدر ب ٥٨.٥8 μM

لقد استعملنا اختبار للمقارنة حول فعالية التثبيط وقمنا باءستعمال دواء DOCÉTAXEL والذي يعتبر اكثر انتشارا في المجال الطبي على خلايا DU_145، LN_229 و U2_O ثم مقارنة النتيجة بفعالية الجزئيات الاخرى .

أن إحداث الموت الخلوي قد تم متابعة بطريقة قياس التدفق الخلوي بإستعمال تقنية الوم المضاعف بملحق ANNEXIN وPI في FACS بعد 48 ساعة من المعالجة لقد لاحظنا أن مختلف العقارات لا تحدث موت خلوي مبرمج متأخر ولا موت خلوي عادي في خلايا LN229 عكس جزئية FC-P01 التي أحدثت موت خلوي متقدم بنسبة 14.48% في الخلايا بالمقارنة مع DMSO (9.63%) و PH-FF (3.35%) وفي الشاهد ب (6.96%) في الأخير تبين أن العنصر FCP01 أكثر نشاط من PHFF لانه يحدث موت خلوي متقدم ومتأخر جد دال بالمقارنة مع PHFF (P≤ 0.0001)

الكلمات المفتاحية: البنج الأبيض ، السمية، مطيافية الكتلة، الرنين المغناطيسي، التدفق الخلوي ، الخطوط الخلوية .

Investigation des Mécanismes Moléculaires d'induction de la cytotoxicité de l'extrait méthanolique de la plante : *Hyoscyamus albus L*

Résumé :

Hyoscyamus albus est une plante appartenant à la famille des solanacées, généralement utilisée en médecine traditionnelle comme un agent neurosédatif en raison de sa richesse en flavonoïdes et d'alcaloïdes. Notre objectif de travail dans un premier temps est d'identifier les molécules actives, d'évaluer leurs activités cytotoxiques et leurs modes d'action des parties aériennes de la plante *H.albus* collectée à partir de la région des Aures-Algérie.

L'étude phytochimique a été réalisée en commençant avec l'extraction par des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, chloroforme et le méthanol) suivi d'une purification de l'extrait méthanolique sur colonne de gel de Séphadex LH-20 puis CCM d'où cinq fractions (C, D, E, F, G) ont été obtenues. À cet effet le screening phytochimique a révélé que HAMEOH est riche en alcaloïdes, terpénoïdes plus que les tanins et les polyphénols.

Le potentiel antiprolifératif et apoptotique des fractions C, D, E, F, G issus de l'extrait méthanolique a été étudié sur les lignées cellulaires du cancer de la prostate (DU-145), (PC-3) et (LNCaP) et celle du glioblastome (U-87 MG) et (U-373 MG) par le test MTT. Nos résultats ont montré que la fraction C possède l'activité la plus importante en induisant les 50% d'inhibition de la croissance dans toutes les lignées cellulaires testées à des différentes concentrations à 73 mg/ml sur DU-145, 187 mg / ml sur PC-3, 96 mg / ml sur U-87 MG et 114 mg / ml sur U-373 MG qui étaient significativement ($P \leq 0.0001$) le plus faible. La fraction G a montré une activité notable contre DU-145, LNCaP et U-373 MG.

Le marquage préliminaire d'apoptose a été constaté par l'utilisation de l'acridine orange sur la lignée PC-3 et les cellules DU-145 qui ont été traitées par la fraction C, le test a révélé l'aspect morphologique d'une cellule en apoptose.

Les fractions F et C ont été prises pour identifier leurs molécules actives due à leurs effets antiprolifératifs intéressants et nous avons utilisé comme technique de séparation l'HPLC préparative, pour le contrôle de purification l'HPLC analytique et analyse avec spectrométrie de masse LC, enfin l'identification en utilisant RMN à proton, RMN à carbone 13 et bidimensionnelle. Ces analyses ont révélé pour que les fractions F et C de cette plante comportent des produits actifs, ces analyses nous ont permis d'identifier pour la première fois dans la plante la quercétin-3 -D-glucopyranosyl-(1 → 6)-B-D-glucopyranoside (Ph-FF), N-trans-Feruloyltyramine (FF-P3), N¹ -(hydro) caffeoyl-N⁸ -(hydro) caffeoylspermidine (FCP01) et l'atropine (FCP02).

Concernant l'activité cytotoxique des molécules identifiées nous avons utilisé le test MTT, le produit FC P01 a été significativement ($P \leq 0.0001$) plus actif que FC P02 et FC P03 et induit une inhibition de la croissance cellulaire avec une IC₅₀ égale à 156 µM sur DU-145 et 221 µM sur LN-229. Les données de viabilité cellulaire ont également démontré que seules les cellules MG U-87 réagissaient au traitement par la molécule Ph FF, avec une IC₅₀ significativement réduite 58 µM. Nous avons évalué l'inhibition proliférative dans un test comparatif d'un médicament chimiothérapeutique, le docétaxel qui est largement utilisé en pratique clinique sur quelques lignées cellulaires comme le DU-145, le LN-229 et le U-2 O et a été comparé avec celle de FPC1 et FPh.

L'induction de l'apoptose par P01 FC et Ph FF a été contrôlée par la technique de cytométrie de flux en utilisant un double marquage des cellules LN-229 avec le kit Annexin V et de PI au FACS.

Après 48 h de traitement, nous avons constaté que les différents traitements n'induisaient pas d'apoptose tardive ni de nécrose dans les cellules LN-229. Au contraire, FC P01 a induit une apoptose précoce dans 14,48% des cellules par rapport au DMSO (9,63%), et au Ph FF (3,35%) et au témoin non traité (6,96%). Le produit FC P01 est avéré plus actif que PhFF car il présente une apoptose précoce et tardive très significative par rapport à Ph FF ($P \leq 0.0001$).

Mots clés: *Hyoscyamus albus*, cytotoxicité, RMN à protons, spectrométrie de masse, cytométrie en flux, lignées cellulaires