

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université El Arbi Ben M'Hidi-Oum El Bouaghi

Faculté des Sciences Exacte et science de la Nature et de la Vie

Département de Science de la nature de la vie

N° D'ordre :.....

Série :.....

***Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister
en Biochimie Appliquée***

Option : Biochimie des produits naturels d'origine végétale

***Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des
extraits polaires du *Cyclamen africanum* Boiss & Reut***

Présentée Par : M^{lle} Mazouz Wissam

Soutenu le : 11 /06/2014

Devant le jury composé de :

<i>Président :</i>	<i>Mr. Zellagui Ammar</i>	<i>Professeur</i>	<i>Univ. d'Oum El Bouaghi</i>
<i>Rapporteur :</i>	<i>M^{lle}. Djeddi Samah</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. d'Annaba</i>
<i>Examineurs :</i>	<i>Mr. Haba Hamada</i>	<i>Professeur</i>	<i>Univ. De Batna</i>
	<i>Mr. Arhab Rabah</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. d'Oum El Bouaghi</i>

Remerciement

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Zellagui Ammar, Professeur à l'Université d'Oum el Bouaghi d'avoir accepté de présider le jury.

Je profite de l'occasion pour exprimer ma profonde reconnaissance à Mademoiselle Djeddi Samah Maître de conférences à l'université d'Annaba tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Messieurs Haba Hamada, Professeur à l'université de Batna, et Arhab Rabeh, Maître de conférences à l'université d'Oum El Bouaghi en acceptant d'examiner ce travail.

Je suis également très reconnaissante envers Mademoiselle Benguati Siham Ingénieur au Laboratoire des Biomolécules Végétales et Amélioration des Plantes, Université d'Oum el Bouaghi pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens également à exprimer mes remerciements à mes collègues pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble. Je ne peux oublier de remercier mes amies Lamia, Kenza et Meryem pour m'avoir toujours soutenu.

Je tiens à remercier aussi :

- Monsieur Benabdelrezzak Saleh, Ingénieur à la conservation des forêts de Guelma, pour sa gentillesse, sa disponibilité et de m'avoir aidé dans la récolte du matériel végétal.

-Les membres du personnel du laboratoire des analyses médicales au sein de l'hôpital Mohammed boudiaf à Oum el Bouaghi, et notamment Madame Ammiar Nadjwa Médecin Microbiologiste et Monsieur Baderi Nacer Responsable du laboratoire.

Enfin, un grand merci aux membres de ma famille qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans mes choix. Merci Maman, Merci Papa, Merci mes Frères et Sœur.

Sommaire

Sommaire

Résumés

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des abréviations et des symboles.....	III
Introduction.....	1

Chapitre I : Le Genre Cyclamen

I- Données botaniques.....	3
I-1-Description du genre <i>Cyclamen</i>	3
I-2-Classification du <i>Cyclamen africanum</i> Boiss & Reut.....	3
I-3-Répartition géographique.....	4
II- Propriétés biologiques du genre <i>Cyclamen</i>	5
II- 1- Introduction.....	5
II- 2- Utilisation en médecine traditionnelle.....	6
II- 3- Activités biologiques reconnues.....	6
III- Travaux antérieurs	7

Chapitre II : Les Polyphénols

I- Les polyphénols.....	11
I-1- Généralités.....	11
I-2- Structure chimique et classification.....	11
I-3- Biosynthèse des composés phénoliques.....	12
I-4- Distribution et localisation des polyphénols.....	13
I-5- Effets biologiques des polyphénols.....	13

Chapitre III : Matériel et Méthodes

I- Matériel végétal	16
II- Préparation des extraits.....	16
II-1- Extractions par les solvants organiques à polarité croissante.....	16
III-Analyse qualitative	18
III-1- Screening phytochimique	18
IV- Analyse quantitative.....	19
IV- 1- Dosage des polyphénols totaux.....	19
V- Évaluation des activités biologiques.....	20
V- 1- Activité antioxydante (test de DPPH)	20
V-2- Activité anticancéreuse.....	21
V-3- Activité antimicrobienne	23

Chapitre IV : Résultats et Discussion

I- Rendement d'extraction	26
II-Analyses qualitatives	26
II-1- Screening phytochimique	26
III- Analyse quantitative.....	28
III- 1- Dosage des polyphénols totaux.....	28
IV- Évaluation des activités biologiques.....	30
IV- 1- Activité antioxydante.....	30
IV- 2- Activité anticancéreuse.....	32
IV- 3- Activité antimicrobienne.....	36
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumés

ملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص المضادة للأكسدة، المضادة للسرطان و المضادة للميكروبات لمستخلصات النوع النباتي المستوطن في شمال إفريقيا *Cyclamen africanum* Boiss & Reut خارج العضوية.

النشاط المضاد للأكسدة درس خارج العضوية بتقنية إرجاع الجذر الحر DPPH . النتائج المتحصل عليها أظهرت ان جميع مستخلصات هذا النوع النباتي ذات نشاط مضاد للأكسدة حيث ان مستخلص الميثانول هو الأكثر نشاطا ($IC_{50} : 429 \text{ mg.l}^{-1}$) بينما مستخلص ثنائي كلور الميثان هو الأقل نشاطا ($IC_{50} : 9.30 \times 10^7 \text{ mg.l}^{-1}$).

القدرة المضادة للسرطان درست خارج العضوية بتقنية MTT ضد خلايا سرطان الثدي BT-484 و MAD-MB-231 مقابل خلايا ثدي سليمة MFC-10 A . النتائج المتحصل عليها أظهرت أن مستخلص الميثانول هو المستخلص الأكثر فاعلية ($IC_{50} : 134.14 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$).

المستخلصات خضعت أيضا للدراسة خارج العضوية للكشف عن نشاطها المضاد للميكروبات ضد سبعة أنواع من البكتيريا الممرضة و نوع واحد من الخميرة، و ذلك باستعمال طريقة الانتشار من خلال قرص صلب. النتائج المتحصل عليها أظهرت أن جميع مستخلصات هذه النبتة ليس لها أي نشاط مضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: *Cyclamen africanum* Boiss & Reut، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للسرطان، النشاط المضاد للميكروبات.

Abstract

This study is devoted to evaluate the *in vitro* antioxidant, antimicrobial and anticancer proprieties of dichloromethane, methanol and methanol-water extracts obtained from the aerial part of *Cyclamen africanum* Boiss & Reut, an endemic species to the North of Africa.

The antioxidant potential of the samples was evaluated using the reduction method of free radical DPPH. The results showed that our extracts can act as free radical scavengers. The MeOH extract represents the highest antioxidant activity with a value = IC_{50} : 429.21 mg.l⁻¹. While the DCM extract represents the lowest antioxidant activity with a value = IC_{50} : 9.30×10^7 mg.l⁻¹.

The anticancer activity was assessed by colorimetric MTT assay. On breast cancer cells BT-484 and MDA-MB-231 versus normal mammary epithelial cells MCF-10A. The results showed that the methanol extract was the most active extract with a value = IC_{50} : 134.14 μ g/ml.

The extracts were also subjected to an antimicrobial potential screening against seven strains of pathogenic bacteria and one yeast species, using the agar diffusion method. The obtained results show that all extracts were inactive against all strains tested.

Keywords: *Cyclamen africanum* Boiss & Reut, antioxidant potentiel, anticancer activity, antimicrobial potential

Résumé :

Notre travail a porté sur l'étude des activités biologiques des extraits bruts du *Cyclamen africanum* Boiss & Reut une espèce endémique à l'Afrique du Nord.

Le potentiel antioxydant des différents échantillons a été évalué en utilisant la méthode de réduction du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré que certains extraits pouvaient agir en tant que piègeurs de radicaux libres et cela s'est traduit par le changement de couleur (du violet au jaune). L'extrait méthanolique a témoigné une forte activité antioxydante atteignant les $70.44 \pm 1.6\%$ avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 429.21 mg.l^{-1} , cependant l'extrait DCM a montré une activité antioxydante beaucoup moins importante de l'ordre de $22.04 \pm 4.3\%$ avec une valeur d'IC₅₀ égale à $9.30 \times 10^7 \text{ mg.l}^{-1}$.

L'activité anticancéreuse des différents extraits étudiés a été évaluée à l'aide de la technique colorimétrique de réduction du MTT vis-à-vis des cellules cancéreuses mammaires BT-484 et MDA-MB-231 et des cellules épithéliales mammaires MCF-10A. Seul l'extrait MeOH s'est révélé le plus actif avec une valeur IC₅₀ de $134.14 \mu\text{g/ml}$.

Un screening relatif à l'activité antimicrobienne des différents extraits étudiés a été réalisé *in vitro* contre sept souches bactériennes pathogènes et une seule souche de levure en employant la méthode de diffusion sur milieu solide. Les résultats obtenus ont montré que l'ensemble des extraits étudiés s'avèrent inactifs contre toutes les souches testées.

Mots clés : *Cyclamen africanum* Boiss & Reut, activité antioxydante, activité anticancéreuse, activité antimicrobienne.

Liste des figures

Figure 1 : <i>Cyclamen africanum</i> Boiss & Reut.....	3
Figure 2: Les différentes classes des composés phénoliques.....	12
Figure 3: Protocole d'extraction du <i>C. africanum</i>	17
Figure 4: Réaction d'un antioxydant avec le DPPH	10
Figure 5: Dispositif utilisé pour réaliser la Vidéo-microscopie	23
Figure 6: Technique d'ensemencement	25
Figure 7: Activité antiradicalaire des extraits du <i>C. africanum</i> et des standards	31
Figure 8 : Activité cytotoxique de l'extrait DCM sur les lignées cellulaires testées.....	33
Figure 9: Activité cytotoxique de l'extrait MeOH sur les lignées cellulaires testées	33
Figure 10 : Activité cytotoxique de l'extrait MeOH-H ₂ O sur les lignées cellulaires testées.....	34
Figure 11 : Morphologie cellulaire des lignées cellulaires après leur manipulation avec nos extraits.....	35
Figure 12: Activité des extraits vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i>	38
Figure 13: Effet antimicrobien des extraits	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition géographique des espèces appartenant au genre <i>Cyclamen</i>	5
Tableau 2 : Travaux antérieurs sur le genre <i>Cyclamen</i>	7
Tableau 3 : Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Cyclamen africanum</i> Boiss & Reut	9
Tableau 4: Coordonnées géographiques de la station de récolte	16
Tableau 5: Rendement d'extraction de <i>C. africanum</i>	26
Tableau 6: Familles chimiques identifiées du <i>C. africanum</i>	27
Tableau 7: Absorbance des échantillons de <i>C. africanum</i> dans le test de dosage des polyphénols totaux	28
Tableau 8: Teneur en polyphénols totaux dans les extraits du <i>C. africanum</i>	29
Tableau 9: Activité de piégeage du DPPH exprimé en (%) des extraits bruts de <i>C. africanum</i> et des standards.....	30
Tableau 10: IC ₅₀ des extraits bruts et des standards.....	31
Tableau 11: Évaluation de la cytotoxicité <i>in vitro</i> des extraits bruts du <i>C. africanum</i> sur des lignées normales et cancéreuses.....	33
Tableau 12: Activité antibactérienne de la gentamicine exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.....	36
Tableau 13: Activité antimicrobienne du l'extrait DCM du <i>C. africanum</i> exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.....	37
Tableau 14: Activité antimicrobienne du l'extrait MeOH- H ₂ O du <i>C. africanum</i> exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.....	37

Liste des abréviations et symboles

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine TriPhosphate

BHT : Butylated HydroxyToluen

copro : coproculture

DCM : DiChloroMéthane

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 1-1-DiPhényl-2-PicrylHydrazyle

ECBU : Examen CyanoBactériologique des Urines

g : gramme

GAE : Gallique Acid Equivalent

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%

MeOH : méthanol

MeOH- H₂O :méthanol-eau

mm : millimètre

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

nm : nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH: potentiel d'hydrogène

ROS : Reactive Oxygen Species

T : température

UV : ultra-violet

v: volume

Introduction

Introduction :

Depuis toujours, l'homme a utilisé son environnement et en particulier les plantes pour se soigner, un des premiers recueils de médicaments d'origine végétale a été découvert dans les ruines de Nippur en 1953 sous forme de plaquettes d'argiles qui remontent au 3^{ème} millénaire avant J-C gravées en caractères cunéiformes (Verdrager, 1978).

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Par ailleurs, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Selon Newman et *al.*, (2003) les médicaments d'origines naturelles présentaient 5% de l'ensemble des nouvelles entités chimiques découvertes entre 1981-2002.

L'expérience a montré que la recherche des molécules bioactives peut se baser sur la richesse de la biodiversité végétale et la connaissance des thérapeutiques traditionnelles, une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales. La recherche de molécules aux propriétés anti-radicalaires dans des plantes de montagne obéit par exemple à cette logique. En effet, celles-ci sont plus exposées aux rayons UV en altitude et ont développé des mécanismes de protection, basés sur des métabolites secondaires spécifiques (Maver et *al.*, 2005).

Néanmoins, il faut noter que le nombre d'espèces végétales diminue et que le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement. Il en résulte une urgence à connaître et protéger les espèces végétales intéressantes et les savoirs qui leur sont associés (Morel, 2012).

L'investigation *in vitro* des activités biologiques des substances naturelles est l'objectif principal des recherches réalisées au Laboratoire « Biomolécules végétales et amélioration des plantes ».

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des activités biologiques d'une primulacée : *Cyclamen africanum* Boiss & Reut.

Le premier chapitre de ce manuscrit représente les travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante, aux propriétés biologiques du genre *Cyclamen* ainsi qu'aux études antérieures réalisées sur le genre.

Le deuxième chapitre est dédié à l'étude des composés phénoliques. Le troisième chapitre est consacré à la partie expérimentale, avec une présentation du matériel et des méthodes utilisées au cours de cette recherche.

Le dernier chapitre résume les résultats obtenus ainsi que leur discussion qui est suivi d'une conclusion générale.

Chapitre I: Le Genre Cyclamen

I- Données botaniques

Dans cette partie nous allons présenter les informations relatives à la description du genre *Cyclamen*, à sa répartition géographique ainsi que ses propriétés biologiques reconnues.

I-1-Description du genre *Cyclamen*

Le nom *Cyclamen* vient du grec *cyclos* qui signifie *cercle* en allusion au pédoncule floral roulé en cercle (Anonyme, 2009).

Les plantes appartenant à ce genre sont vivaces, elles sont caractérisées par de grosses tiges tubéreuses circulaires et aplaties d'où naissent les racines (Bruneton, 2005) (Figure 1).

Les feuilles, ovales-cordées, peu anguleuses ou non, sont généralement vertes foncées et marbrées au-dessus, pourprés au dessous (Bruneton, 2005).

Les fleurs pentamères, vivement colorées (rose, rouge, blanc...). Le calice est campanulé et les divisions de la corolle (20-40mm) brusquement réfléchies ; les étamines sont incluses, la gorge souvent renflée, anguleuse ou dentée (Bruneton, 2005).

La tige s'enroule sur elle-même pour former une sorte de ressort au moment de formation des graines, à l'exception du cyclamen de Persi, dont la tige reste droite (Bonduel, 1990).



Figure 1 : *Cyclamen africanum* Boiss & Reut (The Cyclamen Society, 2010)

I-2-Classification du *Cyclamen africanum* Boiss & Reut

Le nom vernaculaire français de l'espèce est le Cyclamen d'Afrique, cependant le nom arabe est Khobzet ed dib et Hadibi (Anonyme, 2009).

Selon Quezel et Santa (1963) la position systématique du *Cyclamen africanum* Boiss & Reut est représentée comme suit :

Règne : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)

Sous-classe : Magnoliidae

Ordre : Primulales

Famille : Primulaceae

Genre : *Cyclamen*

Espèce : *Cyclamen africanum* Boiss & Reut

I-3-Répartition géographique

Le genre *Cyclamen* regroupe 22 espèces (Takamura et *al.*, 2005) qui sont réparties dans certaines parties de l'Europe, l'Asie occidentale et l'Afrique du Nord (Sugiyama et *al.*, 2008) (Tableau 1). *Cyclamen* d'Afrique est une espèce endémique de l'Afrique du Nord, commune dans le Tell algérien et le littoral Algéro-constantinois. Il est présent dans les forêts et les broussailles (D. G. Des Forêts, 2003; Anonyme, 2009).

Tableau 1 : Répartition géographique des espèces appartenant au genre *Cyclamen* d'après Davis et *al* (1999)

Espèce	Répartition géographique
<i>Cyclamen africanum</i> Boiss & Reut	Algérie (N) et Tunisie (NO)
<i>Cyclamen balearicum</i> Willk	France (S), Espagne (Îles Baléares)
<i>Cyclamen cilicium</i> Boiss & Heldr	Turquie (S)
<i>Cyclamen colchicum</i>	Géorgie
<i>Cyclamen coum</i> Mill	Arménie, Azerbaïdjan, Bulgarie (E), Géorgie, Iran, Liban, Russie, Syrie (O), Turquie
<i>Cyclamen certicum</i>	Grèce (Crète, Karpathos)
<i>Cyclamen cyprium</i> Kotschy	Chypre
<i>Cyclamen graecum</i> Link	Chypre, Grèce, Turquie
<i>Cyclamen hederifolium</i> Aiton	Albanie, France (Corse), Grèce (Crète), Italie

	(Sardaigne, Sicile), Suisse, Turquie (O), Yougoslavie (Former)
<i>Cyclamen intaminatum</i>	Turquie (O et SO)
<i>Cyclamen libanoticum</i> Hildebr	Liban
<i>Cyclamen mirabile</i> Hildebr	Turquie (SO)
<i>Cyclamen parviflorum</i> Poped	Turquie (NE)
<i>Cyclamen persicum</i> Mill	Algérie, Chypre, Grèce (E. Crète, Karpathos, E. Aegean IS, Rhodes), Jordan, Liban, Syrie (O), Tunisie (N), Turquie (S)
<i>Cyclamen pseudibericum</i> Hildebr	Turquie (S)
<i>Cyclamen purpurascens</i> Mill	Autriche, Tchéquie, France (E), Allemagne (S), Hongrie, Italie (N), Pologne (S), Slovaquie, Suisse, Yougoslavie (Former).
<i>Cyclamen repandum</i>	France (SE, Corse), Grèce, Italie (Sardaigne), Suisse (S), Yougoslavie (Former).
<i>Cyclamen rohfsianum</i> Asch	Lybie (N)
<i>Cyclamen somalense</i> Thulin & Warfa	Somalie (N)
<i>Cyclamen trochopteranthum</i>	Turquie (SO)

N : Nord, S : Sud, O : Ouest, E : Est.

II- Propriétés biologiques du genre *Cyclamen*

II- 1- Introduction

Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal constitue la source majeure de médicaments, grâce à la richesse des produits dits du métabolisme secondaires, qui procurent des propriétés curatives appréciables et qu'aucune chimie synthétique et combinatoire ne peut offrir.

L'approche ethnopharmacologique, qui vise l'évaluation scientifique de l'ensemble des pratiques traditionnelles relatives à la médication par les plantes et les substances d'origine naturelle ainsi que la mise en évidence de leurs propriétés curatives constitue la principale voie de découverte de nouvelles molécules candidates à servir de médicaments. Ainsi, sur 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, plus de 11% sont exclusivement produits à partir des plantes médicinales, ce qui indique que ces dernières trouvent encore un

intérêt considérable dans les différentes sociétés et culture, y compris les plus développées (Eddoks et *al.*, 2007).

II- 2- Utilisation en médecine traditionnelle

Égyptiens, Grecs et Romains connaissaient déjà les cyclamens et les utilisaient en médecine.

Le Dr. Leclerc recommande son alcoolature contre les bourdonnements d'oreilles : 10 à 15 gouttes par jour en deux ou trois fois. Cette même teinture s'emploie utilement contre les migraines rebelles et les névralgies (Fournier, 1999).

Fournier (1999) préconise que les adeptes de l'homéopathie utilisent l'essence homéopathique du tubercule frais récolté au printemps, contre toute une série de maux : douleurs de tête et d'oreilles, coryza, maux de dents, troubles de la digestion (météorisme), crises de coliques, chlorose liée à l'aménorrhée, douleurs rhumatismales et goutteuses sans manifestations fébriles, certaines névroses du cœur, teigne aménorrhée, dysménorrhée, crampes de membres inférieurs, diverses maladies de peau.

La racine du cyclamen réduite en pulpe est un bon résolutif, on l'applique sur les tumeurs scrofuleuses, les engorgements indolents et l'œdème (Cazin, 1868).

Le *Cyclamen hederifolium* est utilisé contre les verrues (Pieroni, 2004) et contre les engelures (Guarrera et *al.*, 2008), tandis que *Cyclamen mirabile* est utilisé comme un agent antifongique contre les espèces *Candida* et *Cryptococcus neoformans* (Pawar et *al.*, 2011).

II- 3- Activités biologiques reconnues

Le genre *Cyclamen* est riche en saponines connus pour avoir des activités biologiques intéressantes. Peu de travaux relatifs aux activités biologiques du *Cyclamen* d'Afrique sont rencontrés dans la littérature, cependant certaines espèces appartenant à ce genre possèdent des activités biologiques reconnues, parmi elles le *Cyclamen mirabile* Hildebr récolté en Turquie, dont l'extrait de feuille a montré une forte activité antioxydante (Sarikurkcu, 2011), selon les travaux de Speroni et *al.*, (2007) sur les tubercules du *C. repandum* S. et S. il s'avère que ces derniers possèdent des potentiels anti-inflammatoires et anti-nociceptifs grâce à la présence de saponines triterpéniques.

Les travaux de Emre et *al.*, (2013) ont mis en évidence l'activité larvicide des extraits de tubercules isolés à partir de deux espèces de *Cyclamen*: *C. mirabile* Hildebr et *C. alpinum* Dammann ex Sprenger contre *Culex pipiens* L.

Deux saponines triterpéniques: Saxifragifolin B et Cyclamine isolées du *C. libanoticum* Hildebr et du *C. persicum* Mill ont été décrites pour la première fois et on ont montré de fortes activités cytotoxiques contre des lignées cellulaires du cancer du sein et le carcinome du poumon.

III- Travaux antérieurs

Plusieurs espèces du genre *Cyclamen* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et biologiques. Néanmoins, vu le nombre d'espèces non encore étudiées, ce genre constitue encore une source importante de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique (Tableau 2 et 3).

Tableau 2 : Travaux antérieurs réalisés sur le genre *Cyclamen* L.

L'espèce	Recherche réalisée	Référence
<i>Cyclamen</i> sp	Analyse complète des anthocyanes et des composés liés pour comprendre le changement du couleur des fleurs dans un faisceau d'ions mutants ;	Nakayama et <i>al.</i> , 2012
	Étude des aspects histo-anatomiques et physiologiques ;	Stratu, 2011
	Isolation de l'enzyme 3', 5' hydroxylase responsable de la modification des pigmentations des anthocyanes;	Boase, 2010
	Étude des effets biologiques de l'irradiation du faisceau d'ions lourds sur <i>cyclamen</i> ;	Sugigama et <i>al.</i> , 2007
	Étude de l'hérédité des pigments des fleurs dans les croisements entre les variétés du <i>Cyclamen</i> et du <i>Cyclamen</i>	Takamura, 2005

	<i>purpurascens</i> ;	
	Possibilité de propagation <i>in vitro</i> ;	Seyring et al., 2009
<i>Cyclamen kunetzovii</i> kotov et czernov	Analyse comparative ontogénique;	Luchkina, 2009
<i>Cyclamen adzharicum</i> Tubers	Identification d'un nouveau glycoside triterpène nommé : "3- β -o-[β -D-Xylp(1 \rightarrow 2)]-[β -D-Glcp(1 \rightarrow 2)]-(β -D-Glcp(1 \rightarrow 4)- α -L-Arap)-16 α -hydroxy-13,28-epoxy-30,30-dibutoxyolean;	Tabizde et al., 2009
<i>Cyclamen trochopteranthur</i>	Effets de l'espèce contre les enzymes hépatiques métabolisant les médicaments ;	Arslan et al., 2011
<i>Cyclamen persicum</i> Mill	Étude des caractéristiques florales et le système de reproduction de deux écotypes phénologiques de <i>Cyclamen persicum</i> Mill ;	Tzachor et al., 2008
	Analyse de la protéine embryospécifique du <i>Cyclamen persicum</i> par la technique 2-D DIGE ;	Lyngved et al., 2008
	Possibilité de propagation <i>in vitro</i> ;	Seyring et al., 2009
	Régénération direct par l'utilisation des tissus des semis ;	Abu-Qaoud., 2004
<i>Cyclamen cilicium</i> Boiss & Heldr.	Possibilité de propagation <i>in vitro</i> ;	Seyring et al., 2009
<i>Cyclamen hederifolium</i> Aiton	Possibilité de propagation <i>in vitro</i> ;	Seyring et al., 2009

Les travaux menés sur le *Cyclamen africanum* sont recensés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Travaux antérieurs réalisés sur l'espèce *Cyclamen africanum* Boiss & Reut

Recherches réalisées	Références
<p>Identification de deux nouvelles Oléanane triterpènes saponines:</p> <p>* (3β,20β)-13,28-epoxy-16-oxo-3-{ O-β-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow4)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)]-α-L-arabinopyranosyl }oxy }oleanan-29-al</p> <p>* (3β,16α,20β)-16,28,29-trihydroxy-olean-12-en-3-yl O-4-O-(4-carboxy-3-hydroxy-3-methyl-1-oxobutyl)-β-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow4)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)]-α-L-arabinopyranoside</p>	<p>Bencharif-Betina et al., 2012</p>
<p>Possibilité de propagation <i>in vitro</i> ;</p>	<p>Seyring et al., 2009</p>
<p>Étude cytologique des plantes sauvages et cultivées.</p>	<p>Bennett et Grimshaw, 1991</p>

Chapitre II: Les Polyphénols

II- Les polyphénols

II- 1- Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh et al., 2004). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Ces corps jouent un rôle fondamental car se sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. que consomme l'homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert, et al., 2005).

L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Manallah, 2012).

II-2- Structures chimiques et classification

La structure chimique est composée de un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient, il existe les phénols simples: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les lignanes (Boros, 2010) et les phénols sous forme conjuguée : avec des sucres, des acides organiques, entre eux. Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes:

- Les phénols simples (C6): un seul noyau phénol
- Les flavonoïdes (C6-C3-C6): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C6-C2-C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane (Paraskevi et Moutsatsou, 2007).

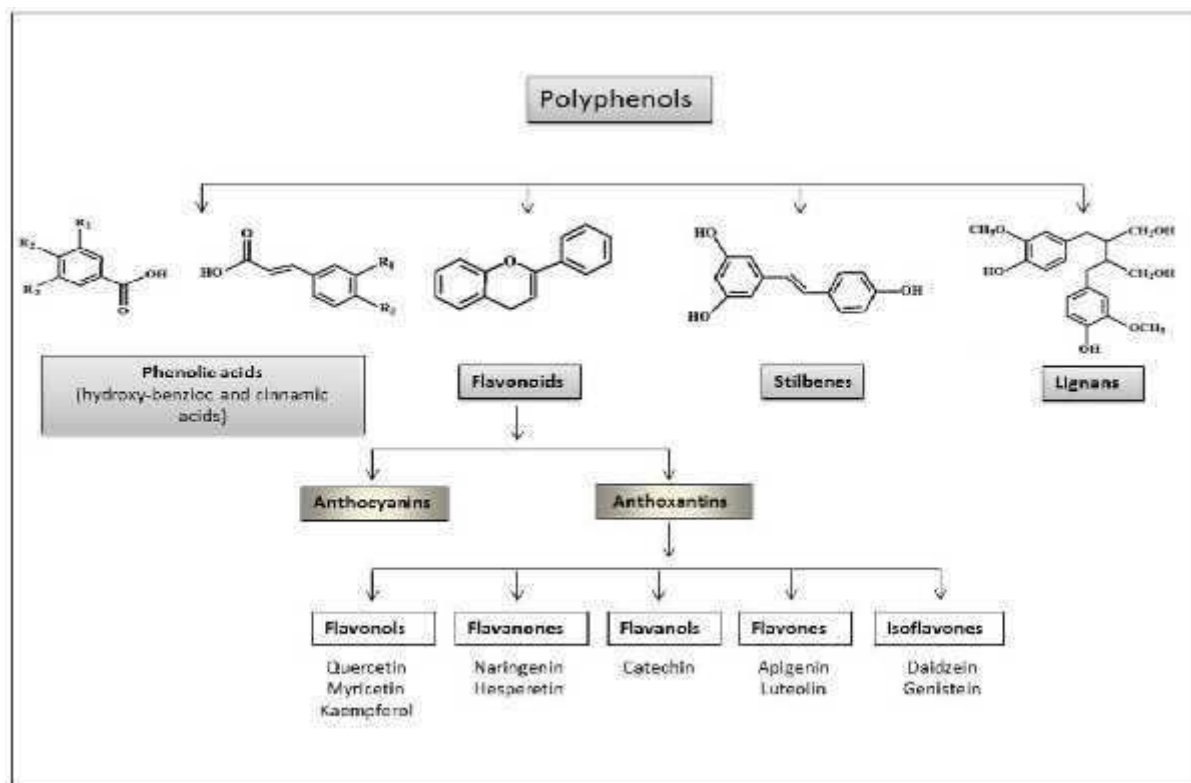


Figure 2 : les différentes classes des composés phénoliques (Câmara et al., 2013)

II-3-Biosynthèse des composés phénoliques

II-3-1-La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Yao et al., 1995).

II-3-2- La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

II-3-3-La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois *Etude* 8 unités malonyl-CoA. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II-4- Distribution et localisation des polyphénols :

Les composés phénoliques sont ubiquitaires dans les espèces végétales, mais leur distribution au tissu végétal, au niveau cellulaire et sub-cellulaire, n'est pas uniforme. Les composés phénoliques insolubles se trouvent dans les parois des cellules, tandis que les composés phénoliques solubles sont présents dans les vacuoles (Vladimir-Knezevic et *al.*, 2012).

Ils sont essentiels à la physiologie de la plante étant impliqués dans diverses fonctions telles que la structure, la pigmentation, la pollinisation, et la résistance des herbivores et des agents pathogènes, ainsi que la croissance et le développement. Les composés phénoliques insolubles, lié à divers composants de la cellule, contribue à la rigidité mécanique des parois cellulaires et joue un rôle régulateur dans la croissance de la plante et de la morphogénèse. Les composés phénoliques qui situent à l'intérieur des cellules prennent une partie de la réponse au stress et aux agents pathogènes (Vladimir-Knezevic et *al.*, 2012).

II-5- Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont de plus en plus utilisés en thérapeutique (Crozier et *al.*, 2010). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (Manach et *al.*, 2005). Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculo-protecteurs (Ghosh et *al.*, 2009). Un certain nombre de molécules polyphénoliques ont été également en étude clinique comme des antiagrégant plaquettaire ou hypotenseur sans résultats probants (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

L'activité antioxydante est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, et avec la plus grande fréquence, les polyphénols, et, en particulier, les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , H_2O_2 , $HOCl$, RO^{\cdot} et ROO^{\cdot}) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (Quideau et *al.*, 2011; Rezaire, 2012).

Les plantes ont une capacité intrinsèque à synthétiser des métabolites secondaires dont certains sont des composés aromatiques de types phénols. Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (Xia *et al.*, 2011).

Tandis que les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes, il a été montré que dans certaines conditions, les flavonoïdes peuvent être pro-oxydants. Cette propriété a été proposée pour rendre compte de plusieurs effets biologiques des flavonoïdes, tels que l'apoptose, qui est induit dans le cadre du stress oxydatif. L'équilibre entre les effets antioxydants et pro-oxydants de ces composés dépend de plusieurs facteurs de l'environnement cellulaire, en particulier sur la présence d'ions de métaux de transition. (Haddad, 2008).

Les groupes hydroxyles de flavonoïdes représentent une grande partie de leur effet antioxydant. Après piégeage ROS, les flavonoïdes sont eux-mêmes oxydés, avec un groupe hydroxyle contenant un radical libre maintenant connu sous le nom d'un radical phénoxy (Nijveldt *et al.*, 2001; Haddad, 2008). Les flavonoïdes qui possèdent une structure catéchol dans le noyau B, leur oxydation peut se traduire par un radical semi-quinone. Par conséquent différents types d'oxydation des flavonoïdes se produisent en fonction de leur structure exacte. En plus de piégeage des ROS, les flavonoïdes peuvent également être oxydés par d'autres moyens. Il s'agit notamment de l'oxydation par les peroxydases cellulaires, ou par auto-oxydation en présence d'oxygène d'un processus considérablement accéléré en présence d'ions de métaux de transition. Il s'agit notamment de l'oxydation par les peroxydases cellulaires, ou par auto-oxydation en présence d'oxygène d'un processus considérablement accéléré en présence d'ions de métaux de transition. (Haddad, 2008)

De nombreuses études épidémiologiques semblent indiquer que des régimes basés sur une importante consommation de fruits et légumes riches en flavonoïdes sont corrélés avec des incidences plus faibles de cancers (Morel, 2012).

Dans une étude évaluant la cytotoxicité de plus de 100 polyphénols de bas poids moléculaire, sur des lignées cellulaires normales et tumorales, il apparaît que les composés sont plus actifs sur les souches cancéreuses que sur les lignées saines (Fukai *et al.*, 2000). Les composés les plus actifs possèdent un groupe hydrophile (hydroxylation) en position vicinale d'un groupe hydrophobe (prényl ou phényl) (Botta *et al.*, 2009 ; Fukai *et al.*, 2000).

Les flavonoïdes agissent à différents niveaux de la cancérogenèse: l'initiation, la promotion et la progression. (Kale et *al.*, 2008 ; Clere et *al.*, 2011 ; Majewska-Wierzbicka et Czczot , 2012)

Le mécanisme complexe d'action anti-tumorale comprend: l'activité anti-oxydante, l'inactivation des agents cancérogènes, activité anti-proliférative, blockage du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et de la différenciation, l'inhibition de l'angiogenèse. (Ren et *al.*, 2003 ; Monasterio et *al.*, 2004 ; Cutler et *al.*, 2008 ; López-Lázaro, 2009 ; Majewska-Wierzbicka et Czczot , 2012).

D'ailleurs, nombreuses études ont prouvés que certains flavonoïdes sont efficace contre le cancer de la peau (Edeas, 2007), cancer du colon (Murthy et *al.*, 2012), cancer gastrique (Matsukawa et *al.*, 1993; Garcia-Cloas et *al.*, 1999 ; Lagiou et *al.*, 2004 ; Rossi et *al.*, 2010), cancer du poumon (Hirvonen et *al.*, 2001) et le cancer du sein (Zi et *al.*, 1998; Lindenmeyer et *al.*, 2001).

Une étude a montré que la quercetine qui augmente l'effet antitumorale du trichostatin A (médicament anticancéreux) par la régulation de l'expression de la protéine p53 (Chan et *al.*, 2013)

Kim et *al.*, (2013) ont démontré que l'acide flavone-8-acétique et l'acide 5, 6-diméthylxanthénone-4-acétique endommagent les tumeurs par l'activation des cellules immunitaires innées.

Chapitre III: Matériels et Méthodes

Notre travail de recherche a été effectué au niveau du Laboratoire «Biomolécules végétales et amélioration des plantes », entre la période allant du Mars au Juillet 2013.

I- Matériel végétal

La récolte du *Cyclamen africanum* Boiss & Reut a été réalisée aléatoirement dans son habitat naturel au niveau la région de Maouna (Wilaya de Guelma, Est d'Algérie) en Mai 2013, avant la période de floraison. Les coordonnées géographiques de la station sont présentées dans le tableau suivant:

Tableau 4 : Coordonnées géographiques de la station de récolte

Station	Altitude	Latitude	Longitude
Foret de Mahouna	1037m	36° 23' 13' 2 ' N	7° 22' 58' 7' E

L'identification du *Cyclamen* d'Afrique à été réalisée par Mr Benabdelrezzak Saleh, Ingénieur à la conservation des forêts de Guelma. Les parties aériennes de l'espèce récoltée, ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Elles ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et conservées dans des sacs propres.

II- Préparation des extraits

II-1- Extractions par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction a été effectuée selon la méthode (un peu modifiée) décrite par Dall'Acqua et al., (2010), où 200 g du matériel végétal a subi une extraction par solvants organiques, cette dernière est effectuée par épuisement successif du matériel végétal, en utilisant trois solvants à polarité croissante : éther de pétrole (600ml), dichlorométhane (600 ml), méthanol (600 ml), ainsi que le mélange hydro-alcoolique méthanol-eau (5 :1, v/v) (600 ml), ces extractions ont été répétées trois fois.

L'extraction a été effectuée à température ambiante durant 72 heures. Après filtration, le résidu a été ensuite concentré par évaporation rotative à l'aide un rotavapeur. La figure suivante illustre les différentes étapes suivies dans cette extraction:

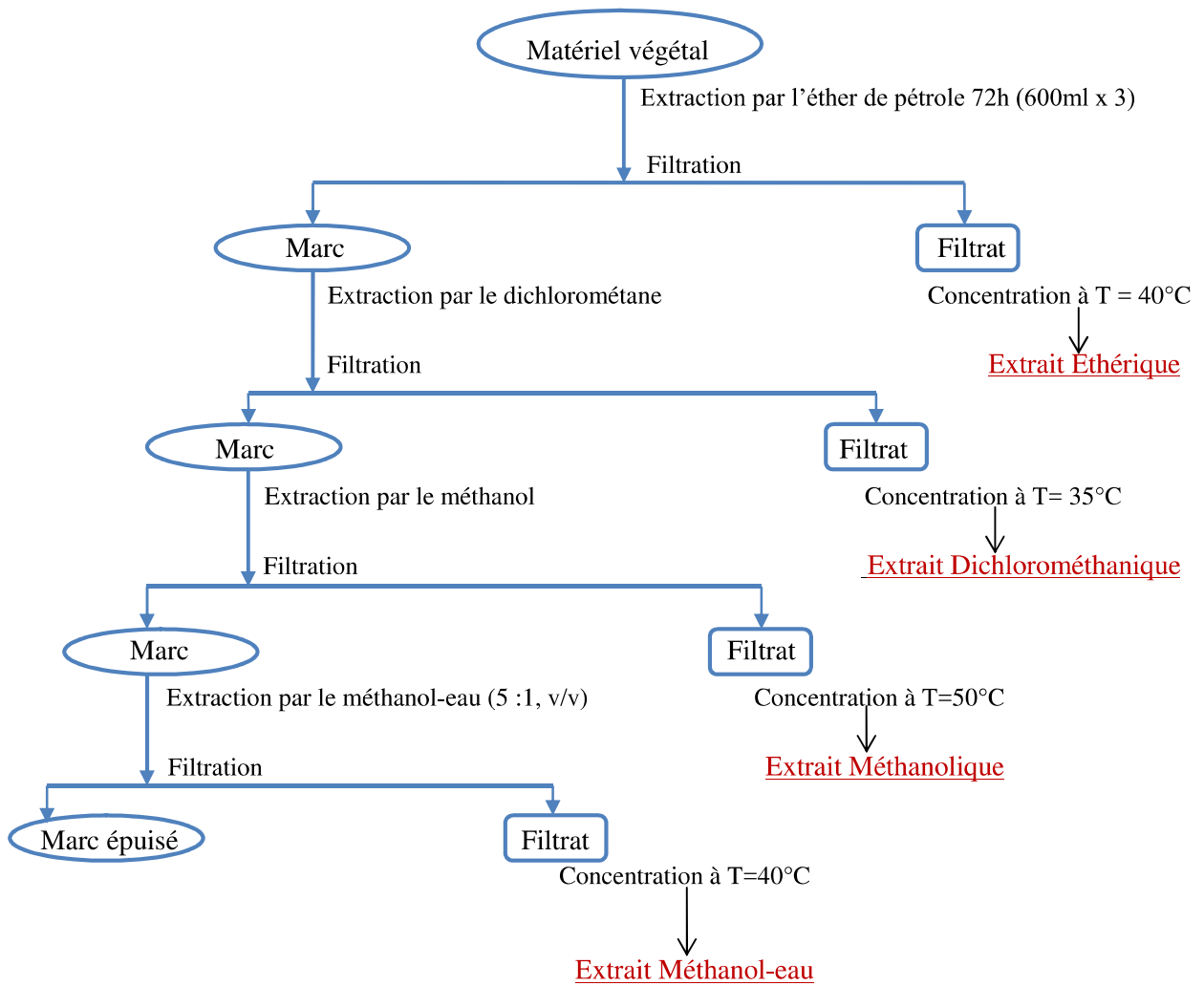


Figure 3: Protocole d'extraction du *C. africanum* (Dall'Acqua et al., 2010)

III-Analyse qualitative

III-1- Screening phytochimique

Le screening phytochimique met en évidence la présence des groupes de familles chimiques (huiles volatiles, stérols & terpènes,...etc) au niveau de la plante, à cet effet nous nous sommes référées aux techniques décrites par Zellagui et *al.*, (2011) pour les trois types d'extraits.

- **Identification des huiles volatiles** : l'extrait éthérique a été évaporé à sec. La présence d'une odeur plaisante indique la présence d'une huile volatile ;
- **Identification des stérols et triterpènes** : ils ont été recherchés par la réaction de Liebermann. Cinq (5) ml de chacun des trois extraits ont été évaporés sur bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 0.5 ml d'anhydride cétyque puis dans 0,5 ml de chloroforme ; nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive;
- **Identification des flavones aglycones**: A l'extrait éthéré on ajoute 2ml de méthanol à 50°, puis on y ajoute 2 copeaux de magnésium et 5 gouttes d'HCl concentré. Une coloration rouge ou orange confirme la présence des flavones aglycones (Réaction de Shibata) ;
- **Identification des anthracenosides** : 1 ml de NH₄OH à 25% a été ajouté à l'extrait éthérique (réaction Bortraegen). Après agitation l'apparition d'une couleur rouge indique la présence d' anthracenosides ;
- **Identification des coumarines** : L'extrait éthérique ou alcoolique a été dissout après le séchage dans l'eau chaude. La solution est partagée en deux volumes égaux: dont l'un contient la référence, et le second est rendu alcaline avec 0,5 ml d'une solution d'ammoniaque diluée à 10% avec l'eau distillée. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV;
- **Identification des tanins**: 2 ml de l'extrait aqueux est additionné de 3 gouttes de la solution diluée de chlorure ferrique. L'apparition d'une couleur bleue noirâtre ou verte noirâtre indique la présence des tanins ;
- **Identification des anthocyanosides**: L'extrait d'alcoolique a été acidifié, la solution acide devient rouge à p^H = 7 et ne change pas de couleur violet au milieu alcalin indique la présence anthocyanosides;

- **Identification des polyuronides (pectines, mucilage et gommés) :** 2 ml de l'extrait ont été ajoutés goutte à goutte dans un tube à essai, où 10 ml d'acétone ont déjà été placés. L'observation d'un précipité sous forme de gros flocon indique la présence des polyuronides.

IV- Analyse quantitative

IV- 1- Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé au niveau de l'Institut de Chimie-physique, N.C.S.R. «Démocritos», Athènes, Grèce.

- **Principe:** Le réactif Folin-Ciocalteu est formé d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$ et d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ qui sont réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W_8O_{23} et demolybdène Mo_8O_3 .
- **Mode opératoire:** La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu décrite par Nikokavoura et *al.*, (2011). 10 ml de chaque extrait testé dissout dans du MeOH) et 1ml d'acide gallique sont dissouts dans 10 ml d'eau distillée, mélangée avec agitation avec 2 ml de réactif Folin-Ciocalteu (2N). 5 ml de carbonate de sodium (7,5 %, m/v) ont ensuite été ajoutés et le mélange a été agité vigoureusement. Le mélange a été dilué jusqu'à 50 ml avec de l'eau distillée, puis incubé à 45 °C dans un bain-marie pendant 15 min, en suite et l'absorbance est lue à 750 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gr d'extrait (mg GAE/gram) selon la formule suivante obtenue de la courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique:

$$\text{Absorbance} = 0.0101 + 241.56415 \times C \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$$

C: concentration de l'acide gallique

V- Évaluation des activités biologiques

V-1-Activité antioxydante (test de DPPH)

Principe : L'activité antiradicalaire des extraits étudiés est évaluée en mesurant leurs capacités à piéger le radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl), qui est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres selon la réaction suivante (Boudjellal, 2009):

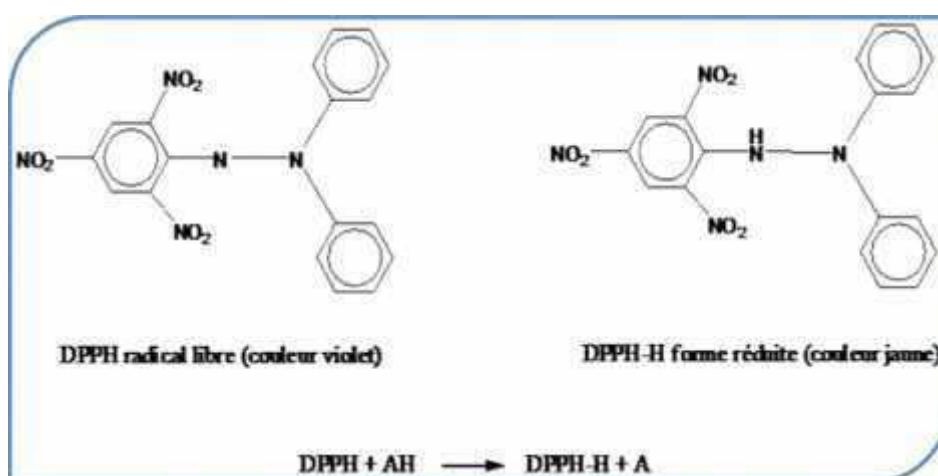


Figure 4: Réaction d'un antioxydant avec le DPPH (Molineux , 2004)

Mode opératoire: Ce test a été réalisé selon les recommandations de Bounatirou et *al.*, (2007).

➤ Préparation de la solution mère du DPPH

2.4mg de DPPH ont été dissouts dans 100ml de méthanol et mis sous agitation pendant 30 min.

➤ Préparation des différents extraits

50mg des différents extraits de *C. africanum* ont été dissouts dans 50ml de méthanol avec une agitation de 10mn (solutions mères). Les solutions mères ont subit plusieurs dilutions afin d'obtenir différentes concentrations : 100, 250, 500, 750 et 1000 mg/l.

Nous avons utilisé le BHT (butylated hydroxytoluene) et l'acide gallique comme contrôles positifs, leur préparation a été comme suit : 50 mg de chaque contrôle ont été dissouts dans 50ml de méthanol et mis sous agitation pendant 10 minutes.

➤ L'essai au DPPH

Dans des flacons, on introduit 2ml de la solution de DPPH, additionnée de 100µl de l'échantillon à tester. Les flacons sont ensuite mis à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois. Les absorbances sont mesurées à 517 nm avec un spectrophotomètre type Jenway 6705 UV/Vis.

Le blanc est réalisé par l'addition de 2ml de la solution de DPPH et 100µl de méthanol. Celui-ci est également répété 3 fois.

L'activité antioxydante des différents échantillons testés a été estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = [\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs blanc}] \times 100.$$

Les résultats ont été également exprimés par la moyenne de trois mesures séparés \pm écart type. Le paramètre IC₅₀ est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité.

V-2- Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse du *C. africanum* a été évaluée selon la méthode colorimétrique du MTT décrite par (Tu et *al.*, 2010), au Centre d'excellence pour la recherche sur le cancer, l'Université médicale de Taipei, Taiwan.

➤ **Lignées cellulaires et milieux de culture**

Nous avons utilisé des cellules suivantes:

MCF-10A cellules épithéliales mammaires (ATCC, Manassas, USA).

BT-483 cellules cancéreuses mammaires (Hôpital universitaire de Taipei, Taiwan).

MDA-MB-23 cellules cancéreuses mammaires (Hôpital général de Cathay, Taiwan).

Toutes les cellules ont été cultivées dans un milieu approprié Mediatech (Carlsbad, CA, USA) contenant 10% de sérum de veau fœtal et un mélange de pénicilline et streptomycine. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂.

➤ **Test MTT pour l'évaluation de la croissance cellulaire**

Le test colorimétrique MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium est un test qui permet d'évaluer la croissance d'une lignée cellulaire donnée. Il est basé sur la réduction du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase présente dans la membrane interne des mitochondries. Le formazan est soluble dans le DMSO dans lequel il donne une coloration violette dont l'intensité est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Kouamé et *al.*, 2009).

L'ensemencement est fait dans des plaques de 96 puits à des concentrations variantes allant de $1,5 \cdot 10^5$ à $5 \cdot 10^5$ cellules/ml selon la lignée cellulaire étudiée. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur (37°C, 5% CO₂ pendant 24h). Ensuite, les cellules sont incubées avec les différents extraits à tester pendant 72h. Les extraits du *C. africanum* ont été utilisés à des concentrations croissantes allant de 0 à 2000 µg /ml. Chaque niveau de concentration a été répété 4 fois. A la fin de l'incubation, le milieu de culture est retiré et remplacé par le réactif MTT. Après incubation à 37°C le MTT est retirée en retournant délicatement les plaques sur du papier absorbant. Les cristaux de formazan formés sont alors dissous dans le DMSO et la densité optique est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 570 nm (avec une référence de 630nm).

➤ **Vidéo-microscopie ou Tracking:** La visualisation directe des effets des extraits à été réalisée au moyen de microscope à contraste de phases assisté par ordinateur (). Ce système est placé dans un environnement thermostaté à 37°C. Un film est réalisé à la fin de l'expérience à partir des photos prises toutes les 4 minutes.



Figure 5: Dispositif utilisé pour réaliser la Vidéo-microscopie

V-3- Activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits nous avons utilisé la méthode de la diffusion des disques en milieu gélosé. Cette méthode simple permet la détermination de la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits étudiées et de certains antibiotiques. Cette méthode a été réalisée niveau du laboratoire microbiologie de l'université d'Oum Bouaghi.

- **Les souches testées :** Les extraits ont été testés vis-à-vis de plusieurs souches antimicrobiennes :
- ✓ Souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : *Staphylococcus aureus* ATCC 252923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 (les souches ATCC proviennent du laboratoire de bactériologie, Hôpital universitaire de Constantine);
 - ✓ Souches isolées cliniquement: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* , *Salmonella* sp (isolées de coproculture), *Sterptococcus* sp (isolées d'ECBU) ;
 - ✓ Souche fongique: la levure *Candida albicans* (isolées d'ECBU).

- **Les milieux de culture :** Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :
 - ✓ La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
 - ✓ La gélose Mueller Hinton (gélose Muller Hinton et 5% du sang pour *Streptococcus* sp) pour l'étude de la sensibilité des bactéries ;
 - ✓ La gélose Sabouraud pour l'isolement, l'entretien et l'étude de la sensibilité de la levure ;

- **Préparation de l'inoculum:** Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive et incubé durant la nuit. Après 18 heures d'incubation, 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques de chaque souche à étudier ont été raclées à l'aide d'une anse de platine. L'anse est déchargée dans 5ml d'eau physiologique stérile, la suspension bactérienne est bien homogénéisée son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.1 lue à 600nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum (Rahal, 2005).

- **L'ensemencement**

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Puis l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées, l'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui même. A la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (Rahal, 2005) (Figure 6).

- **Extraits testés NCCLS (1997) :** La gélose appropriée est coulée dans des boîtes de pétri de 90mm de diamètre et inoculée avec une suspension microbienne contenant approximativement 10^7 cfu fraîchement préparée. Deux répétitions sont préparées pour chaque souche. Cinq disques de papier Whatman stériles (6mm) sont déposés à la surface de la gélose ensemencée à l'aide d'une pince, chaque disque correspond à une concentration : 100mg/l ; 250mg/l ; 500mg/l ; 750mg/l et 1000mg/l.

Chaque disque est imbibé de 20µl de chaque extrait, un disque de gentamicine (30µg) (*un antibiotique de la famille des aminosides, actif contre une grande variété de bactéries*

(Corporation Baxter, 2012)) a été utilisée comme contrôle positif, l'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés.

➤ **Étude statistique**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel statistique Origin 9. Les résultats ont été présentés par la moyenne \pm écart type (n = 2, n = 3 et n = 4).

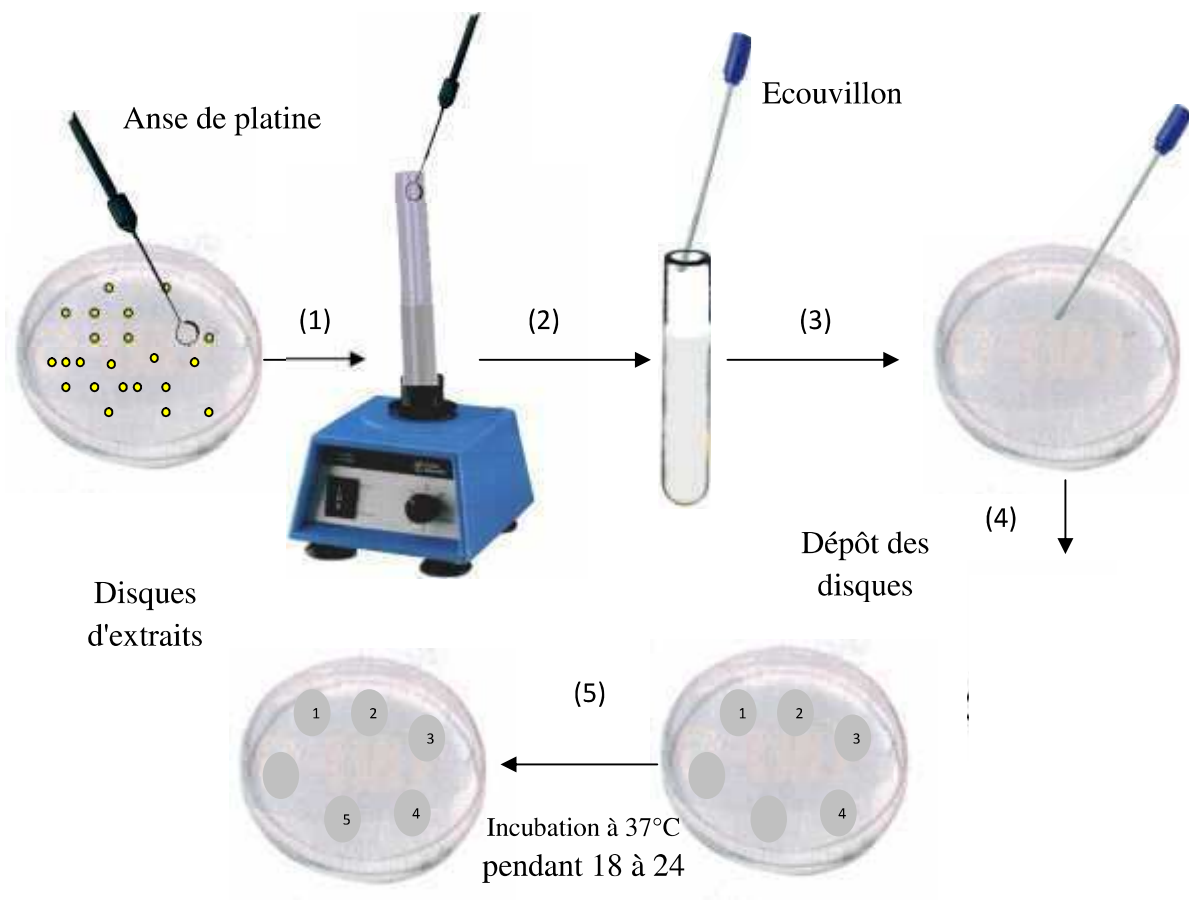


Figure 6: Technique d'ensemencement

Chapitre IV: Résultats et Discussion

I- Rendement d'extraction

En utilisant les solvants organiques nous avons obtenus quatre extraits bruts, en suivant la méthode décrite par Dall'Aqua et *al.*, (2010). Ces extractions ont permis d'obtenir les extraits bruts suivants: l'extrait éthérique (EP), l'extrait dichlorométhane (DCM), l'extrait méthanolique (MeOH) et l'extrait méthanol-eau (MeOH-H₂O).

Tous les rendements d'extraction sont exprimés en pourcentage de la masse d'extrait par rapport à la masse de la plante séchée (**tableau 5**), selon les résultats obtenus, il s'avère que le mélange MeOH-eau a présenté le plus haut pourcentage de rendement (7.25%), suivie du MeOH avec (6.88%) en comparaison avec les autres solvants organiques utilisés dont le rendement d'extraction était trop faible et n'excèdent pas les 1.61%.

Tableau 5: Rendement d'extraction de *C. africanum*

Solvant	Rendement d'extraction (%)
Ether de pétrole	1.56
Dichlorométhane	1.61
Méthanol	6.88
Méthanol-eau (5:1)	7.25

Les résultats obtenus lors d'études similaires menées sur d'autres espèces végétales ont indiqué que les solvants polaires sont les plus efficaces à extraire les matières organiques, ceci est en accord avec les résultats obtenus lors de cette étude (Dall'Aqua et *al.*, 2010; Roby et *al.*, 2013).

Selon Rezaire (2012) des valeurs plus élevées de rendement peuvent être obtenues avec l'utilisation de solvants acidifiés. L'hydrolyse de liaisons intermoléculaires en milieu acide explique cette augmentation.

II-Analyses qualitative

II-1- Screening phytochimique

L'identification ou bien la détection des groupes chimiques à partir de la partie aérienne du *C. africanum* a été effectuée selon le protocole décrit par Zellagui et *al.*, (2011), les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : Familles chimiques identifiées du *C. africanum*

Les groupes chimiques	<i>C. africanum</i>
Les huiles volatiles	++
Les tannins	+++
les polyuronides	+++
Les stérols	+/-
Les tritépènes	+/-
Les flavones aglycones	-
Les anthracenosides aglycones	-

(+) : positif, (-) : négatif, (+ -) : traces

Les résultats des tests de la composition chimique montrent la présence des huiles volatiles, tanins et des polyuronides:

- * La présence des huiles a été confirmée par une forte odeur distincte.
- * La présence de tanins et confirmée par le développement d'une coloration verdâtre.
- * La formation d'un précipité sous forme de gros flocon, indique la présence des polyuronides.

Les stérols et les tritépènes sont présents en quantités faibles, et leur présence a été confirmée par l'apparition, à l'interphase, d'un anneau rouge brunâtre.

Il faut noter que des manipulations relatives à l'identification du groupe des anthocyanosides, le pH enregistré pour l'extrait alcoolique était de 5.73, alors que le principe de cette réaction est basé sur l'acidification d'une solution basique, ce qui nous a semblé un peu étrange, surtout que dans la littérature aucune référence n'a fait allusion à un tel résultat.

III- Analyse quantitative

III- 1- Dosage des polyphénols totaux

L'étude quantitative des extraits bruts, obtenus à partir du *C. africanum*, au moyen du dosage spectrophotométrique avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux.

Les quantités des polyphénols totaux ont été rapportées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/gr) et déterminées par l'équation de type:

$$y = a x + b$$

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Nikokavoura et *al.*, 2011). L'acide gallique a été utilisé comme étalon. Les résultats sont représentés dans les **tableaux 7 et 8**:

Tableau 7: Absorbance des échantillons de *C. africanum* dans le test de dosage des polyphénols totaux

Échantillons (mg l ⁻¹)	Absorbance (nm)		Moyenne ± SD (nm)
	1 ^{ère} Répétition	2 ^{ème} Répétition	
DCM	0.045	0.051	0,048 ± 0,00
MeOH	0.228	0.250	0,239 ± 0,01
MeOH-H ₂ O	0.245	0.315	0,280 ± 0,04

Tableau 8: Teneur en polyphénols totaux dans les extraits du *C. africanum*

Extraits	Teneur en polyphénols (mg GAEs/gr d'extrait)
DCM	53.04
MeOH	321.98
MeOH-H ₂ O	377.4

L'extrait MeOH-H₂O représente la teneur la plus élevée en polyphénols: 377.4 (mg GAEs/gr d'extrait), ce résultat atteste de la grande richesse de la partie aérienne du *Cyclamen africanum* en substances polyphénoliques, en comparaison avec la teneures des polyphénols dans l'extrait DCM qui représente une teneur faible en polyphénols totaux avec 53.04 (mg GAEs/gr d'extrait). Cela est dû du fait que les composés phénoliques sont extraits souvent en quantités plus élevées dans des solvants plus polaires (Gupta et al., 2013 ; Seal et al., 2013 ; Seal et al., 2012). Plusieurs recherches antérieures confirme cette hypothèse et ont montré que le MeOH-H₂O est le solvant le plus efficace pour extraire les composés phénoliques du *Lysimachia laxa*, *Gymnocladus assamicus* (Gupta et al., 2013), son de riz (Chatha et al., 2006), les feuilles du *Aloe barbadensis* (Sultana et al., 2009) et les feuilles du *Moringa oleifera* (Siddhuraju et Becker, 2003).

Ces tendances sont en accord avec de nombreux résultats issus de la littérature, pour lesquels la quantité de composés phénoliques n'est pas favorisée dans le cas d'extraits utilisant des solvants purs, mais le sont par l'emploi de solvants mixtes. La présence d'eau dans ces derniers augmenterait la perméabilité des tissus végétaux et favoriserait le phénomène de diffusion de masse dans l'étape d'extraction (Rezaire, 2012).

III-Évaluation des activités biologiques

Dans la présente étude, on a évalué trois activités biologiques antioxydante, anticancéreuse et antimicrobienne des extraits bruts de la partie aérienne de l'espèce *Cyclamen africanum* et il faut noter que les activités biologiques de cette espèce n'ont pas été précédemment rapportées dans la littérature.

III-1-Activité antioxydante

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Cao et Prior, 1998). Dans la présente étude afin d'évaluer le potentiel antioxydant des différents extraits nous avons réalisé seulement le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes (Bounatirou et *al.*, 2007).

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique du DPPH en présence d'un antioxydant. La forme non radicalaire DPPH-H est formée, l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits bruts a été fait en comparaison avec celle des différents antioxydants standard: BHT (antioxydant synthétique), et l'acide gallique (antioxydant semi-synthétique).

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition en fonction de concentrations de ces extraits. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 9: Activité de piégeage du DPPH exprimé en (%) des extraits bruts de *C. africanum* et des standards

Concentrations (mg l ⁻¹)	Extraits bruts du <i>C. africanum</i>			Antioxydants Standards	
	DCM	MeOH	MeOH- H ₂ O	BHT	Acide Gallique
100	16.92 ± 0.837	29.516 ± 1.579	21.033 ± 5.060	59.293 ± 5.771	87.746 ± 0.721
250	17.943 ± 0.109	36.533 ± 0.385	39.546 ± 3.466	82.046 ± 2.938	88.200 ± 0.294
500	17.753 ± 0.290	47.430 ± 0.773	46.276 ± 10.380	86.790 ± 0.913	88.776 ± 0.109
750	19.096 ± 2.297	61.210 ± 2.818	55.126 ± 2.324	87.560 ± 0.294	87.946 ± 1.057
1000	22.046 ± 4.30	70.440 ± 1.656	64.286 ± 12.718	88.006 ± 0.109	89.096 ± 0.295

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions ± écart-type

Les différentes valeurs d'IC₅₀ sont représentées dans le tableau ci-dessous, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC₅₀ sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de ces extraits (**Figure 7**).

Tableau 10 : IC₅₀ des extraits bruts et des standards

Extraits et Standards	IC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
DCM	9.30 x 10 ⁷
MeOH	429.21
MeOH-H ₂ O	524.60
Acide gallique	6.19 x 10 ⁻¹⁷
BHT	56.72

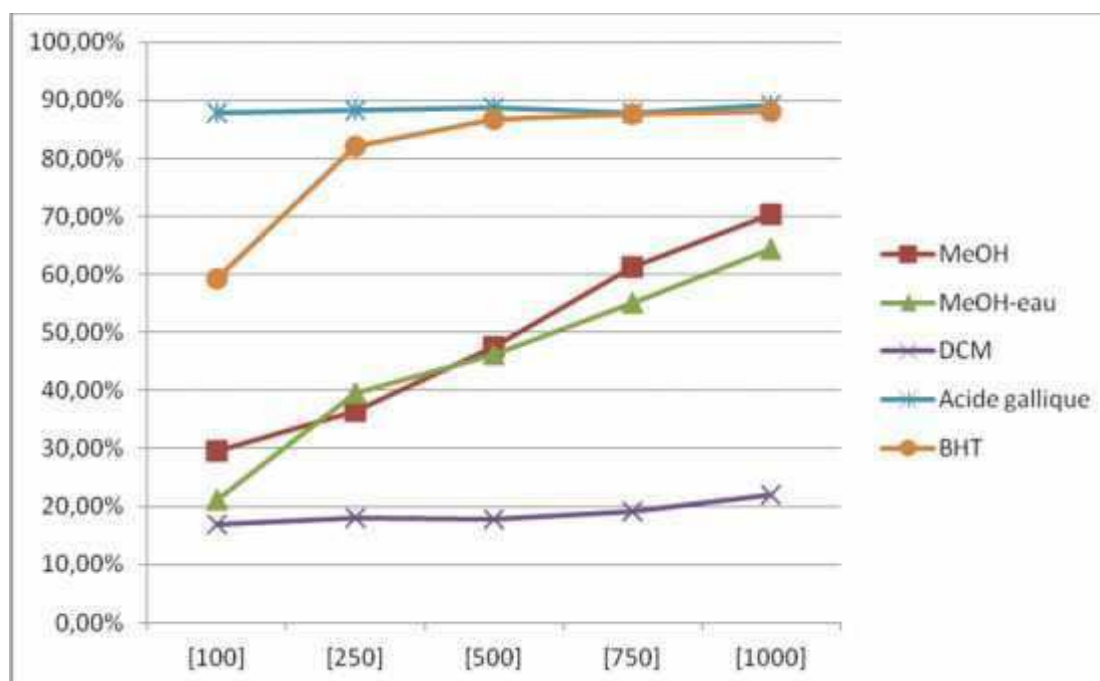


Figure 7 : Activité antiradicalaire des extraits du *C. africanum* et des standards

Les résultats obtenus montrent que les extraits polaires du *C. africanum* ainsi que les standards utilisés possédaient une activité antioxydante significative avec des valeurs IC₅₀ comprises entre 6.19 x 10⁻¹⁷ et 429.21 mg .l⁻¹. Cependant l'extrait apolaire a montré une faible activité 9.30 x 10⁷.

L'extrait MeOH possède l'activité antioxydante la plus élevée (IC_{50} : 429.21 mg.l⁻¹) suivi de l'extrait MeOH- H₂O et finalement l'extrait DCM (9.30×10^7 mg .l⁻¹) qui a montré le potentiel antioxydant le plus bas, mais l'activité antioxydante des extraits reste légèrement inférieure à celle des standards utilisés.

Cette activité peut être due surtout à la présence de composés polyphénoliques présents en teneurs élevée dans les deux extraits.

Les capacités de piégeage du radical sont classées dans l'ordre : Acide gallique > BHT > MeOH > MeOH-H₂O > DCM

Selon Rezaire (2012) l'influence de la polarité du solvant dans un milieu acidifié (ou non), et en présence (ou non) d'une étape de délipidation met en évidence que l'utilisation de solvant mixte de polarité intermédiaire permet d'aboutir à une activité antioxydante significative si on la compare à celle du composé de référence testé.

Des résultats similaires ont été obtenus lors d'études réalisées sur d'autres espèces du genre *Cyclamen*, mené par Sarikurkcü (2011) où le chercheur a évalué le potentiel antioxydant des feuilles du *Cyclamen mirabile* les résultats obtenus ont montrés que l'extrait méthanolique était le plus actif avec une valeur égale à 88.25%.

Le coefficient linéaire entre la teneur en polyphénols dans les extraits et leur potentiel antioxydant est $r = -0.987$.

IV-2- Activité anticancéreuse

L'activité inhibitrice de la croissance des cellules cancéreuse des extraits DCM, MeOH et MeOH-H₂O obtenus à partir de *Cyclamen africanum* a été évaluée, au moyen du test colorimétrique MTT, sur des cellules de cancer du sein BT-484 et MDA-MB-231 et des cellules épithéliales mammaires MCF-10A.

Les résultats représentés dans le **tableau 11 et les figures 8, 9 et 10** montrent que seule l'extrait DCM montre une activité cytotoxique vis-à-vis les deux lignées cancéreuses, alors que les extraits MeOH et MeOH-H₂O ont montré seulement une activité contre la lignée cancéreuse MDA-MB-231.

Tableau 11: Évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des extraits bruts du *C. africanum*

Cellules	IC ₅₀ (µg/ml)		
	DCM	MeOH	MeOH- H ₂ O
BT-484	553.25	-	-
MDA-MB-231	437	134.14	495.95
MCF-10A	929.28	180.01	703.91

Le pourcentage de la viabilité des cellules testées avec les différents extraits est représentées dans les figures suivantes:

Cellules de cancer du sein

Cellules épithéliales mammaires

BT-484

MDA-MB-231

MCF-10A

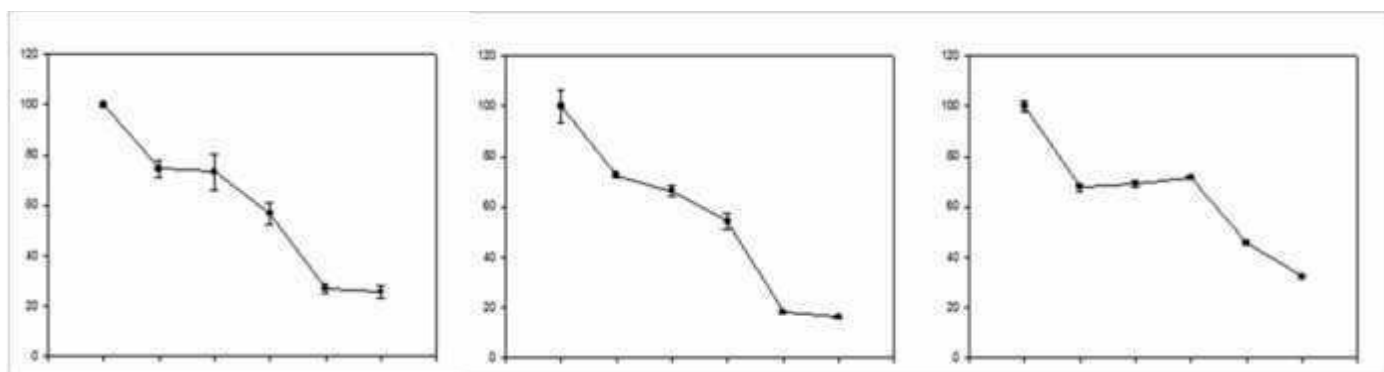


Figure 8 : Activité cytotoxique de l'extrait DCM sur les lignées cellulaires testées

Cellules de cancer du sein

Cellules épithéliales mammaires

BT-484

MDA-MB-231

MCF-10A

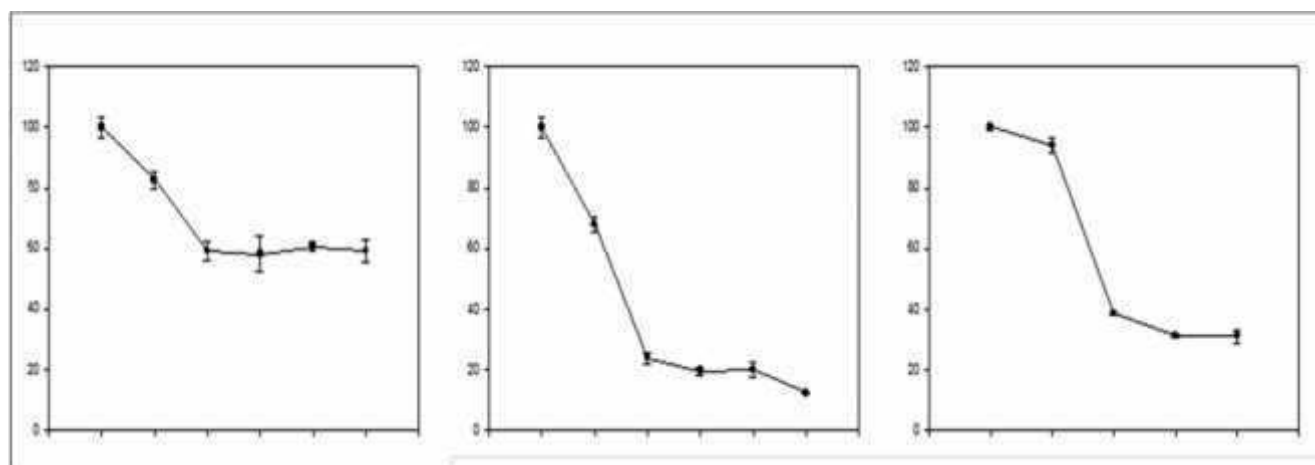


Figure 9 : Activité cytotoxique de l'extrait MeOH sur les lignées cellulaires testées

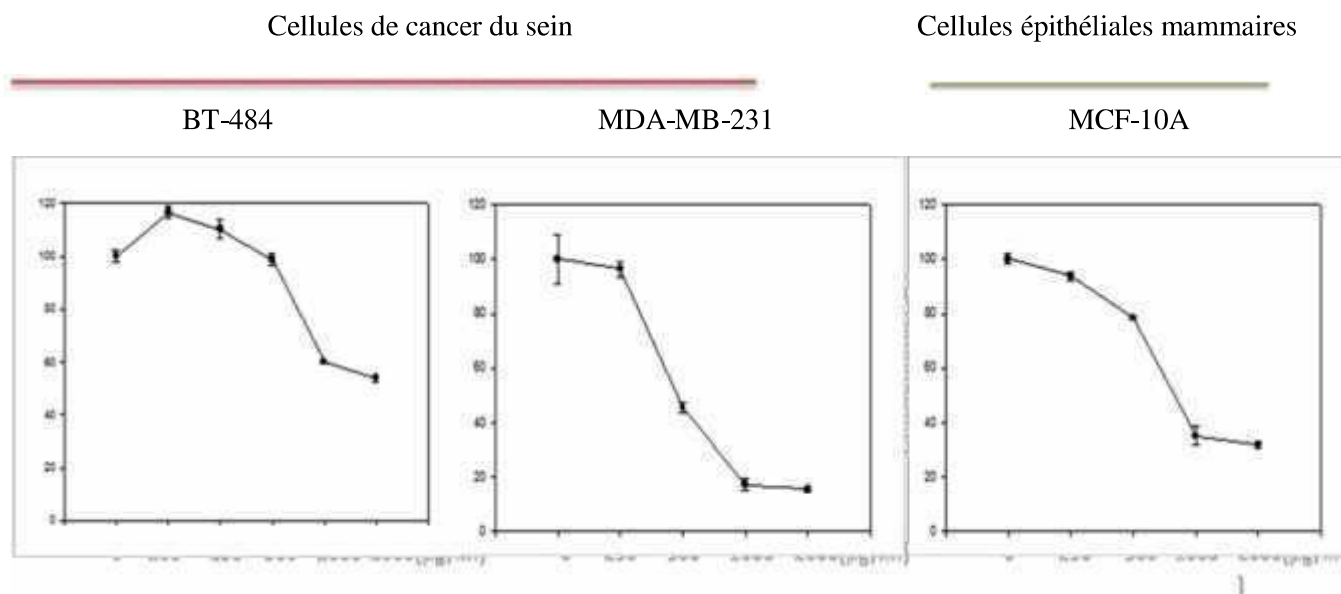


Figure 10 : Activité cytotoxique de l'extrait MeOH-H₂O sur les lignées cellulaires testées

L'extrait MeOH est l'extrait le plus actif contre la lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB-231 (IC₅₀: 134.14 µg/ml) et les cellules épithéliales mammaires MCF-10A (IC₅₀: 180.01 µg/ml) suivie par l'extrait DCM pour la lignée MDA-MB-231 (IC₅₀: 437 µg/ml).

Une étude récente a montré que les extraits du *Cyclamen persicum* ont une efficacité cytotoxique contre les lignées cellulaires cancéreuse PC3 et Raw164-7 avec des concentrations inhibitrices virantes entre 62.5 et 500 µg/ml (Basharat, 2013).

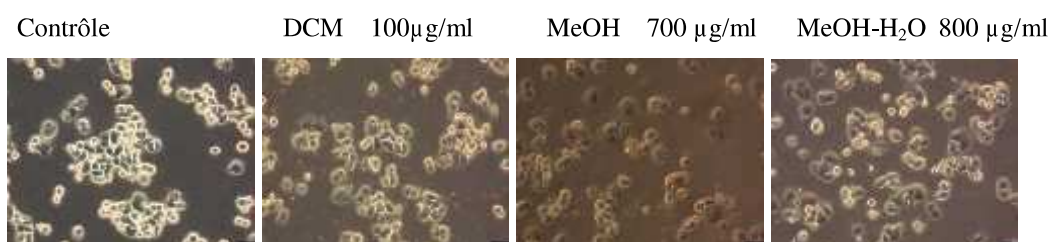
Quelques travaux antérieurs ont prouvés que les espèces *Ganoderma lucidum* (Lee et al, 2004), *Embllica officinalis* et *Vernonia anthelmintica* (Lambertini et al., 2013) ont montrés une activité inhibitrice contre la lignée cellulaire MDA-MB-231.

Plusieurs études ont montré que certains extraits végétaux ont une activité anticarcinogénique reconnue, nous pouvons cité comme exemple: le saffron (*Crocus sativus* L) (Abdullaev et al., 2003), les fruits du *Terminalia chebula* (contre le cancer du sein et le cancer de la prostate) (Saleem et al, 2002), les racines du *Platycodon grandiflorum* (Lee et al, 2004), *Abutilon hirtum* (contre le cancer du sein) (Wesley et al, 2013), *Cynodon dactylon* (Khelifi et al., 2013), *Punica granatum* contre les lignées cellulaires cancéreuses A375, HCT116 et HepG2 (Joseph et al., 2013), *Pandanus amaryllifolius* contre le cancer du sein (Ghasemzadeh et Jaafar, 2013), *Salvia officinalis* contre trois lignées cellulaires de mélanome humain: A375, M14, et A2058 (Russo et al., 2013) et les deux espèces *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L contre le cancer du la vessie humaine RT112, carcinome du larynx humain Hep2 et la leucémie myéloïde humaine K562 (khlifi et al., 2013).

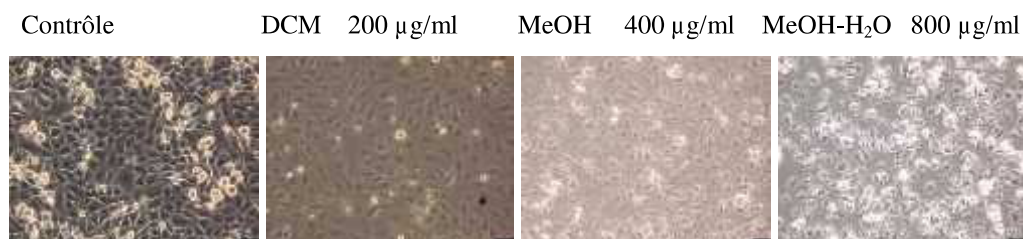
Une corrélation linéaire significative a été observée ($r = 0.3627$) entre le pouvoir antioxydant et anticancéreux des extraits. Tandis que la corrélation entre la teneur en polyphénols des extraits et leur pouvoir anticancéreux est $r = -0.209$.

Les résultats de la vidéomicroscopie sont représentés dans la figure suivante:

La lignée cellulaire BT-483



La lignée cellulaire MDA-MB-231



La lignée cellulaire MCF-10A

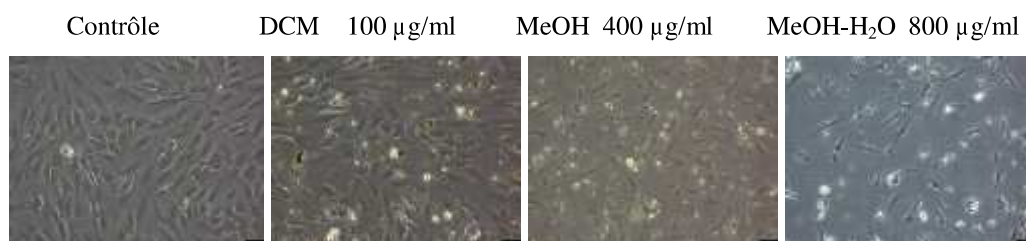


Figure 11 : Morphologie cellulaire des lignées cellulaires après leur manipulation avec nos extraits.

IV-3- Activité antimicrobienne

Les résultats antimicrobiens des extraits évalués sont regroupés dans les **tableaux 13 et 14**. Les valeurs indiquées sont les moyennes de deux mesures.

Les résultats présentés dans les **tableaux 13 et 14** ont montré que l'extrait méthanolique n'a présenté aucune activité antimicrobienne contre les souches testés, l'extrait dichlorométhanique et méthanol-eau ont montré une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Tous ces extraits sont considérés comme inactifs par rapport au contrôle positif qui a une forte activité contre toutes les souches bactériennes testées.

Les résultats des zones d'inhibitions des microorganismes vis-à-vis de l'antibiotique gentamicine sont regroupé dans le tableau suivant:

Tableau 12: Activité antibactérienne de la gentamicine exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

Les souches microbiennes	La gentamicine
<i>E. coli</i> ATCC 25922	39.5 ± 0.707
<i>K. oxytoca</i>	14 ± 1.414
<i>K. pneumonie</i>	15 ± 0.000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	39 ± 1.414
<i>Salmonella</i> sp	34.5 ± 0.707
<i>Streptococcus</i> sp	32 ± 2.828
<i>S. aureus</i> ATCC 252923	10.5 ± 0.707

Chaque valeur représente la moyenne des deux répétitions ± écart-type

La sensibilité aux différentes souches a été classée par le diamètre de la zone d'inhibition comme se suit (Ponce et al., 2003):

- Diamètre moins de 8 mm: non sensible;
- Diamètre de 9-14 mm: sensible;
- Diamètre 15-19 mm: très sensible;
- Diamètre supérieur à 20 mm: extrêmement sensible.

Tableau 13: activité antimicrobienne du l'extrait DCM du *C. africanum* exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

Les souches microbiennes	Les dilutions du DCM du <i>C. africanum</i> (mg.l ⁻¹)				
	100	250	500	750	1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-	-
<i>K. pneumonie</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.0 ± 0.000	6.7 ± 0.353	7.5 ± 0.707	8.7 ± 0.353	9.5 ± 0.707
<i>Salmonella sp</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus sp</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 252923	-	-	-	-	-
<i>Candida sp</i>	-	-	-	-	-

Chaque valeur représente la moyenne des deux répétitions ± écart-type

Tableau 14: Activité antimicrobienne du l'extrait MeOH- H₂O du *C. africanum* exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

Les souches microbiennes	Les dilutions du MeOH-eau (mg.l ⁻¹)				
	100	250	500	750	1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-	-
<i>K. pneumonie</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.0 ± 0.000	7.0 ± 1.414	8.5 ± 0.707	7.5 ± 0.707	6.5 ± 0.707
<i>Salmonella sp</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus sp</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 252923	-	-	-	-	-
<i>Candida sp</i>	-	-	-	-	-

Chaque valeur représente la moyenne des deux répétitions ± écart-type

Podolak et al., (1998) ont montré que les pigments quinoïdes isolés du *Lysimachia vulgaris* L. (*Primulaceae*) ont une activité significative contre la levure *Candida albicans*.

Une autre étude a prouvée que les extraits dichlorométhanique et éthyl acétate d'*Anagallis foemina* Miller et *Anagallis arvensis* (deux espèces appartiennent à la famille des *Primulaceae*) peuvent inhiber la croissance du *Rhizopus stolonifer* (López et al., 2008)

La période de la récolte de la plante peut influencer l'activité antimicrobienne des extraits bruts. Bounatirou et al., (2007) ont prouvé que l'huile essentielle du *Thymus capitatus* n'a aucune activité antibactérienne en période de pré-floraison, alors qu'elle présente une activité antibactérienne plus élevée pendant la période de floraison.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne peut aussi influencer les résultats, Natarajan et al., (2005) et Fazeli et al., (2007) ont constaté que la méthode de diffusion des puits est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de l'*Euphorbia fusiformis* et hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*, en comparaison avec la méthode de diffusion en milieu gélosé.



P. aeruginosa (DCM)



P. aeruginosa (MeOH- H₂O)



P. aeruginosa (MeOH)

1: [1000 mg.l⁻¹], 2: [750 mg.l⁻¹], 3: [500 mg.l⁻¹], 4: [250 mg.l⁻¹], 5: [100 mg.l⁻¹], T: témoin (la gentamicine)

Figure 12: Activité des extraits vis-à-vis *P. aeruginosa*



Salmonella sp (DCM)



K. oxytoca (MeOH)



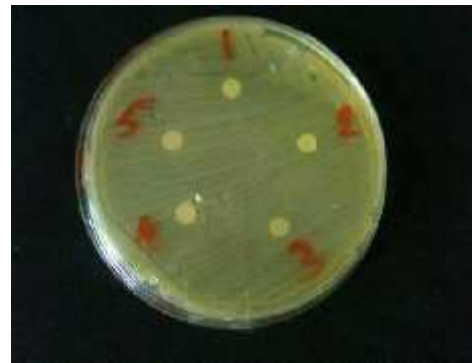
E. coli (MeOH- H₂O)



K. pneumoniae (MeOH- H₂O)



S. aureus (DCM)



Salmonella sp (MeOH)

1: [1000 mg.l⁻¹], 2: [750 mg.l⁻¹], 3: [500 mg.l⁻¹], 4: [250 mg.l⁻¹], 5: [100 mg.l⁻¹]

Figure 13: Effet antimicrobien des extraits

Conclusion

Conclusion

Dans le présent travail on s'est intéressé aux propriétés biologiques de la partie aérienne du *Cyclamen africanum* Boiss & Reut. Pour cela quatre extraits ont été préparés: extrait éthérique, dichlorométhanique, méthanolique et méthanol-eau (5:1).

Le potentiel antiradicalaire a été testé *in vitro* en utilisant le radical libre 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Les résultats obtenus ont montré que les extraits testés ont montré une activité antioxydante variables (forte pour les extraits polaires et faibles pour les extraits apolaires), il a été noté que l'extrait méthanolique ($IC_{50} = 429.21 \text{ mg.l}^{-1}$) est l'extrait le plus actif suivi de l'extrait méthanol-eau (5:1) ($IC_{50} = 524.60 \text{ mg.l}^{-1}$), alors que l'extrait dichlorométhanique ($IC_{50} = 9.30 \times 10^7 \text{ mg.l}^{-1}$) qui présente l'activité antioxydante la plus faible.

L'activité anticancéreuse du *C. africanum* a été évaluée en utilisant le test colorimétrique MTT vis-à-vis des cellules du cancer de sein BT-484 et MDA-MB-231 et des cellules épithéliales mammaires MCF-10A. Suivant les résultats que nous avons obtenu expérimentalement, nous avons remarqué que seul l'extrait dichlorométhanique qui a présenté une activité contre toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées ($IC_{50} = 553.25 \text{ } \mu\text{g/ml}$ pour la lignée BT-484 et $437 \mu\text{g/ml}$ pour la lignée MDA-MB-231). Alors que les extraits méthanolique et méthanol-eau sont actifs seulement contre la ligne cancéreuse MDA-MB-231 et la ligne saine MCF-10A. Parmi ces extraits, l'extrait méthanol présente l'activité anticancéreuse la plus élevée ($IC_{50} = 134.14 \mu\text{g/ml}$ pour la lignée MDA-MB-231 et $IC_{50} = 180.01 \mu\text{g/ml}$ pour la lignée MCF-10A). On a remarqué également l'existence d'une corrélation significative entre le potentiel antioxydant et anticancéreux ce qui nous confirmons que l'activité antioxydante est l'une des mécanismes anticancéreux.

En ce qui concerne l'activité microbienne, nous avons étudiée *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé contre trois souches bactériennes ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 252923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922), quatre souches bactériennes de prélèvement (*Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp, *Sterptococcus* sp) et une levure (*Candida albicans*).

Les résultats obtenus ont montré que seul l'extrait méthanolique a présenté une légère activité contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Tandis que les extraits dichlorométhanique et méthanol-eau (5:1) n'ont montré aucune activité contre toutes les souches microbiennes testées.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives.

Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Références Bibliographiques

Les Références Bibliographiques

A

- Abdullaev, F. I., L. Riverón-Negrete, H. Caballero-Ortega, J. Manuel Hernández, I. Pérez-López, R. Pereda-Miranda et J.J. Espinosa-Aguirre, 2003, Use of *In Vitro* Assays to Assess The Potential Antigenotoxic and Cytotoxic Effects of Saffron (*Crocus sativus* L.), *Toxicology in Vitro*, 17 : 1-6 ;
- Abu-Qaoud, H., 2004, Direct Regeneration in *Cyclamen Persicum* Mill. Using Seedling Tissues, *An-Najah Univ. J. Res. (N. Sc.)*, Vol. 18(2) ;
- Akowauh, G.A., I. Zhari, I. Norgyati, A. Sadikun et S. M. Khamsah , 2004, The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, 87: 559-566.
- Alinezhad, H., M. Zare, S. F. Nabavi, A. Naqinezhad et S. M. Nabavi, 2012, Antioxidant, Antihemolytic, and Inhibitory Activities of Endemic *Primula heterochroma* Against Fe²⁺-induced Lipid Peroxidation and Oxidative Stress In Rat Brain *in vitro*, *Pharmaceutical Biology*, 50(11) : 1391-1396 ;
- Ammar, S., M. A. Mahjoub, H. Ben Abdelkader, K. Liouane, I. Skandarani, L. Chekirghedira et Z. Mighri, 2008, Mutagenic, Antimutagenic and Antioxidant Activities of a new Polyphenolic and a Flavonoid Substances Isolated from *Anagallis monelli*, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* ;
- Anonyme, 2009, Guide illustré de la flore Algérienne. Wilaya d'Alger et Mairie de Paris, avec le soutien du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes de la République française.

B

- Bahorun, T, 1997, Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritas*, p83-94.
- Bencharif-Betina, S., T. Miyamoto, C. Tanaka, Z. Kabouche, A. C. Mitaine-Offier et M. A. Lacaille-Dubois, 2012, Two New Triterpene Saponins from *Cyclamen africanum*, *Planta Med*; 78 - PI298;

- Beldjoudi , N., L. Mambu , M. Labaïed , P. Grellier , D. Ramanitrahassimbola , P. Rasoanaivo , M. T. Martin et F. Frappier, 2003, Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and Their Antiplasmodial Activity, *J. Nat. Prod.*, 2003, 66 (11), pp 1447–1450 ;
- Boase, M. R., D. H. Lewis, K. M. Davies, G. B. Marshall, D. P. Patel, K. E. Schwinn et S. C. Deroles, 2010, Isolation and Antisense Suppression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase Modifies Flower Pigments and Colour In *Cyclamen*, *BMC Plant Biology*, 10:107;
- Boudjellal, K., 2009, Etude de l'Activité Biologique : Des Extraits Du l'*Elaeagnus angustifolia* L, Mémoire de Magister ;
- Bonduel, J., 1990, Les Plantes Bulbeuses, Larousse, p: 63;
- Botta B., P. Menendez , G. Zappia , R. A. D. Lima, R. Torge et G. D. Monache, 2009, Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006), *Current Medicinal Chemistry*; 16: 3414-3468 ;
- Bounatirou, S., S. Smiti, M. G. Miguel, L. Faleiro, M. N. Rejeb, M. Neffati, M. M. Costa, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso et L. G. Pedro, 2007. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils Isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff.et Link. *Food Chemistry*, 105: 146–155;
- Bsharat, M. M. M., 2013, *In vitro* cytotoxic and cytostatic activities of plants used in traditional Arabic herbal medicine to treat cancer in Palestine, Thèse de Master, Université de Nablus (Palestine) ;
- Bruneton, J., 2005, Plantes Toxiques, Végétaux Dangereux Pour L'homme et Les Animaux, Tec & Doc Lavoisier, 3^{ème} éditions, p :461 ;
- Bruneton J., 1999, Pharmacognosie et Phytochimie des Plantes Médicinales, 3^{ème} Ed Tec & Doc. Paris ;
- C
- Calderon-Montano, M., J. Burgos-Moron, E. Perez-Guerrero et C. Lopez-Lazaro, 2011, A Review On The Dietary Flavonoid Kaempferol : Mini Reviews in Medicinal Chemistry, Volume 11, Number 4, pp. 298-344(47) ;
- Cao, G. et R. L. Prior, 1998, "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum." *Clinical Chemistry* **44**(6): 1309-1315.
- Cazin, F. J., 1868, Traité Pratique et Raisonné des Plantes Médicinales Indigènes, Troisième Edition, P. Asselin, p: 360;

- Chan ,ST, N. C. Yang, C. S. Huang, J. W. Liao et S. L. Yeh, 2013, Quercetin Enhances The Antitumor Activity of Trichostatin A Through Upregulation of p53 Protein Expression *In Vitro* And *In Vivo*, PLoS One. 2013;8(1):e54255 ;
- Chen, W., J. Zhuang, Y. Li, Y. Shen et X. Zheng, 2013, Myricitrin Protects Against Peroxynitrite-Mediated DNA Damage and Cytotoxicity In Astrocytes, Food Chemistry, Volume 141, Issue 2, , Pages 927–933 ;
- Clere N, S. Faure , M. C. Martinez et R. Andriantsitohaina , 2011, Anticancer Properties of Flavonoids: Roles In Various Stages of Carcinogenesis, Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.;9(2):62-77 ;
- Corporation Baxter, 2012, Monographie de Gentamicine(e) : 26 ;
- Crozier,A.,D io, D.,Clifford, 2010, Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31 : 446–467.
- Cutler, G. J., J. A. Nettleton, J. A. Ross, L. J. Harnack, D. R. Jacobs, C. G. Scrafford, L. M. Barraj, P. J. Mink et K. Robien, 2008, Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cancer In Postmenopausal Women: The Iowa Women's Health Study, Int J Cancer, 123(3): 664–671 ;.

D

- Dall'Acqua, S. , I. Castagliuolo, P. Brun, F. Ditadi, G. Palù et G. Innocenti, 2010, Triterpene Glycosides With *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity from *Cyclamen repandum* Tubers, Carbohydrate Research 345, pp : 711 ;
- Davis, A.P., H.M. Gough, B.Mathew et C. Grey-Wilson, 1999, CITES Bulb Checklist for the genera: *Cyclamen*, *Galanthus* and, *Sternbergia*, the Trustees of the Royal Botanic Gardens Kew, pp: 35-46;
- Direction générale des forets (D.G. Des Forets), 2003. Fiche descriptive sur Les Zones Humides Ramsar ;

E

- Edeas, M., 2007, Les Polyphénols et Les Polyphénols de Thé, Phytothérapie, N° : 5, pp : 267, 268 ;
- Eddouks, E, M. L. Ouahidi, O. Farid, A. Moufid, A. Khalidi et A. Lemhadri, 2007, L'utilisation Des Plantes Médicinales dans Le Traitement du Diabète au Maroc, Phytothérapie, p: 195;

El Hosry, L., C. D. Giorgio, C. Birer , J. Habib, M. Tueni, S. Bun , G. Herbette , M. D. Meo , E. Ollivier et R. Elias, 2014, *In vitro* cytotoxic and anticlastogenic activities of saxifragifolin B and cyclamin isolated from *Cyclamen persicum* and *Cyclamen libanoticum* ;

Emre, O., S. Koc, O. D. Dusen, R. Mammadov et H. Cetin, 2013 Larvicidal activity of Cyclamen (Myrsinaceae) extracts against the larvae of West Nile virus vector *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 449-452.

F

Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N. 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18: 646-649 ;

Fournier, P., 1999, *Plantes Médicinales et Vénéneuses de France*, Tome II: Consoude à Melon, *Connaissances et Mémoires Européennes- Société nationale d'horticulture de France*, pp 33-34-35;

G

Ghasemzadeh, A. et H. Z. E. Jaafar, 2013, Profiling of Phenolic Compounds and Their Antioxidant and Anticancer Activities in Pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) Extracts from Different Locations of Malaysia, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:341 ;

Ghosh, D., A. Scheepens, 2009,.Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*,53 : 322 – 331.

Guarrera, P. M., F. Lucchese et S. Medori, 2008, Ethnophytotherapeutical Research in the High Molise Region (Central-Southern Italy), *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 4:7;

Guesmi, A. et Boudabous, A., 2006, Activité Antimicrobienne de Cinq Huiles Essentielles Associées dans Les Produits De Thalassothérapie, *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, p. 224-230 ;

Gupta, S., S. Sarma, A. A. Mao et T. Seal, 2013, Antioxidant Activity of Different Parts of *Lysimachia laxa* and *Gymnocladus assamicus*, a Comparison Using Three Different Solvent Extraction Systems, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5 (4) : 33-40 ;

H

Haddad, A. Q., 2008, The Cellular and Molecular Proprieties of Flavonoids In Prostate Cancer Chemoprevention, Thèse de Doctorat, Université de Toronto ;

Hirvonen, T., T. Virtamo, P. Korhonen, D. Albaes et P. Pietinen, 2001, Flavonol and Flavone Intake and the Risk of Cancer In Male Smokers (Finland), *Cancer Causes and Control*, 12 : 789-796 ;

J

Joseph, M. M, S. R. Aravind, S. K. George, S. Varghese et T. T. Sreelekla, 2013, A Galactomannan Polysaccharide from *Punica granatum* Imparts *In Vitro* and *In Vivo* Anticancer Activity, *Carbohydrate Polymers*, 98(2): 1466-1475;

Jimenez-Gonzalez L., M. Alvarez-Corral, M. Munoz-Dorado et I. Rodriguez-Garcia, 2008, Pterocarpan : interesting natural products with antifungal activity and other biological Properties, *Phytochemistry Reviews* , 7: 125-154 ;

K

Kale, A., S. Gawande et S. Kotwal, 2008, Cancer Phytotherapeutics: Role For Flavonoids At The Cellular Level, *Phytotherapy Research*, Volume 22, Issue 5, pages 567–577 ;

Khlifi, D., E. A. Hayouni, A. Valentin, S. Cazaux, B. Moukarzil, M. Hamid et J. Bouajila, 2013, LC–MS Analysis, Anticancer, Antioxidant and Antimalarial Activities of *Cynodon dactylon* L. extracts, *Industrial Crops and Products*, 45 : 240-247 ;

Khlifi, D., R. M. Sghaier, S. Amouri, D. Laouini, M. Hamdi et J. Bouajila, 2013, Composition and Anti-oxidant, Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L, *Food and Chemical Toxicology*, 55 : 202-208 ;

Kouamé, J., C. Gnoula, E. Palé, H. Bassolé, I. P. Guissou, J. Simporé et J. B. Nikiéma, 2009, Étude des Propriétés Cytotoxiques et Antiradicalaires d'Extraits de Feuilles et de Galles de *Geriera Senegalensis* J. F. Gmel (*Combretaceae*), *Sciences et Techniques*, Vol 32, n°1 et 2 ;

L

Lambertini, E., R. Piva, M. T. H. Khan, I. Lampronti, N. Bianchi, M. Borgatti et R. Gambari, 2013, Effects of Extracts from Bangladeshi Medicinal Plants on *In Vitro* Proliferation of Human Breast Cancer Cell Lines and Expression of Estrogen Receptor α Gene, *International Journal of Oncology*, 419-423 ;

- Lee, J. W, W. I. Hwang et S. T. Lim, 2004, Antioxidant and Anticancer Activities of Organic Extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle Roots, *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 409–415 ;
- Lindenmeyer F, H. Li, S. Menashi , C. Soria et H. Lu, 2001, Apigenin Acts On The Tumor Cell Invasion Process and Regulates Protease Production, *Nutr Cancer.*, 39(1):139-47 ;
- López-Lázaro, M., 2009, Distribution and Biological Activities of The Flavonoid Luteolin, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Volume 9, Number 1, pp. 31-59(29) ;
- López, V., S. Akerreta, E. Casanova, J. García-Mina, R. Cavero et M. Calvo, 2008, Screening of Spanish Medicinal Plants for Antioxidant and Antifungal Activities, *Pharmaceutical Biology*, 602-609 ;
- Luchkina, M. A., 2010, Comparative Ontogenic Analysis of *Cyclamen coum* Mill and *Cyclamen kuznetzovii* Kotov et Czernov, *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, Vol. 65, No. 2, pp. 84–89;
- Lu, Q. Y., M. R. Sartippour, M. N. Brooks, Q. Zhang, M. Hardy, V. L. Go, F. P. Li et D. Heber, 2004, Ganoderma Lucidum Spore Extract Inhibits Endothelial and Breast Cancer Cells *In Vitro*, *Oncology Reports*, 659-662 ;
- Lyngved, R., J. Renaut, J. F. Hausman , T. H. Iversen et A.K. Hvoslef-Eide, 2008, Embryo-specific Proteins in *Cyclamen persicum* Analyzed with 2-D DIGE, *Journal of Plant Growth Regulation* , Volume 27, Issue 4, pp 353-369 ;

M

- Majewska-Wierzbička, M. et H. Czeżot, 2012, Anticancer Activity of Flavonoids, *Polski Merkuriusz Lekarski : Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 33(198):364-369 ;
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, 2005, Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16 : 1–8.
- Manallah A. 2012, Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europea* L. Mémoire de magister, Université Frhat Abes Sétif , 132p
- Martin, S. et R. Andriantsitohaina, 2002, Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304–315.
- Maver M., Queiroz E. F., Wolfender J., et Hostettmann K., 2005, Flavonoids from the Stem of *Eriophorum scheuchzeri*. *J. Nat. Prod*, 68, 1094-1098.

Matsukawa, Y., N. Marui , T. Sakai , Y. Satomi , M. Yoshida , K. Matsumoto , H. Nishino , A. Aoike , 1993, Genistein arrests cell cycle progression at G2-M, *Cancer Res.*,53(6):1328-31 ;

Molineux P, 2004, The Use of The Stable Radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J-Sci.Technol*, 26:211-219 ;

Morel, S., 2012, Étude Phytochimique et Évaluation Biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae), Thèse de Doctorat, Université d'Angrès ;

Murthy, K. N. C, J. Kim, A. Vikram et B. S. Patil, 2012, Differential Inhibition of Human Colon Cancer Cells by Structurally Similar Flavonoids of Citrus, *Food Chemistry*, Volume 132, Issue 1, Pages : 27-34 ;

N

Nakayama, M., N. Tanikawa, Y. Morita et Y. Ban, 2012, Comprehensive Analyses of Anthocyanin and Related Compounds to Understand Flower Color Change In Ion-Beam Mutants of Cyclamen (*Cyclamen* spp.) and Carnation (*Dianthus caryophyllus*), *Plant Biotechnology* 29, 215–221 ;

Natarajan, D., S. John Britto, k. Srinivasan, N. Nagamurugan, C. Mohanasundari et G. Perumal, 2005, Anti-Bacterial Activity of *Euphorbia fusiformis*-A Rare Medicinal Herb, *J. Ethnopharmacol.*, 102: 123-126;

NCCLS, 1997, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A7.National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA ;

Newman D. J., G. M. Cragg et K. M. Snader K. M., 2003, Naturel products as sources of new brugs over the period 1981-202. *J. Nat. Prod*, 66, 1022-1037.

Nijveldt, R. J., E. V. Nood, E. C. V. Hoorn, P. G. Boeleus, K. V. Norren et P. A. M. V. Leenwen, 2001, Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications, *Am J Clin Nutr*, 74:418–25 ;

Nikokavoura, A., D. Christodouleas, E. Yannakopoulou, K. Papadopoulos et A.C. Calokerinos, 2011, Evaluation of antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic compounds in edible oils by a novel fluorimetric method, *Talanta*, 84 : 874-880 ;

P

- Patel, J. M, 2008, A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids, Lethbridge Undergraduate Research Journal, Volume 3, Number 2 ;
- Pawar, H. A., A. V. Shenoy, P. D. Narawade, P. Y. Soni, P. P. Shanbhag et V. A. Rajal, 2011, Preservatives from Nature: A Review, International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, 1(2): 82-83;
- Pieroni, A., C. L. Quave et R. F. Santoro, 2004, Folk Pharmaceutical knowledge in the Territory of the Dolomiti Lucane, Inland Southern Italy, Journal of Ethnopharmacology 95 (2004) 373–384;
- Podolak, I., M. Elas et K. Cieszka, 1998, *In Vitro* Antifungal and Cytotoxic Activity of Triterpene Saponosides and Quinoid Pigments from *Lysimachia vulgaris* L, Phytotherapy Research, 12 : 70-73 ;
- Ponce A.G., R. Fritz, C. Del Valle and S.I. Roura, 2003. Antimicrobial Activity of Essential Oils on the Native Microflora of Organic Swiss Chard. LWT-Food Science and Technology, 36: 679-684;

Q

- Quezél, P. et S. Santa, 1963, Nouvelle Flore de l'Algérie et Des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, Centre Nationale de La Recherche Scientifique, p : 722 ;
- Quideau, S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus et L. Pouységu ,2011, "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie - International Edition* 50(3): 586-621.

R

- Rahal K., 2005, Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème Ed, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière
- Ren, W., Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu et L. Zhang, 2003, Flavonoids : Promising anticancer agents, Medicinal Research Reviews, Volume : 23, Issue : 4, pp : 519-534 ;
- Rezaire A., 2012, Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), thèse de doctorat Université des Antilles et de la Guyane, p : 215;

- Roby, M. H. H., M. A. Sarhan, K. A. H. Selim et K. I. Khalel, 2013. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extracts. *Industrial Crops and Products*, 43: 827–83;
- Ross, J. A. et C. M. Kasum, 2002, DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety, *Annual Review of Nutrition*,
- Rossi, M., V. Rosato, C. Bosetti, P. Lagiou, M. Parpinel, P. Bertuccio, E. Negri et C. La Vecchia, 2010, Flavonoids, Proanthocyanidins, and The Risk of Stomach Cancer, *Cancer Causes and Control*, Vol : 21, No : 10, pp : 1507-1604 ;
- Russo, A., C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Delfine, V. Cardile, S. Rosselli et M. Bruno, 2013, Chemical Composition and Anticancer Activity of Essential Oils of Mediterranean Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Different Environmental Conditions, *Food and Chemical Toxicology* 55 : 42–47 ;

S

- Saad, B., H. Azaizeh et O. Said, 2008, Arab Herbal Medicine. *Botanical Medicine in Clinical Practicem*, 4: 31 ;
- Saleem, A., M. Husheem, P. Härkönen et K. Pihlaja, 2002, Inhibition of Cancer Cell Growth by Crude Extract and the Phenolics of *Terminalia chebula* retz. Fruit, *Journal of Ethnopharmacology*, 81 : 327-336 ;
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C, 2005, Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287–306.
- Sarikurkcü, C., 2011, Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. Tubers and Leaves, *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(5) : 831-839,
- Seal, T., B. Pillai et K. Chaudhuri, 2013, Effect of Solvent Extraction System on The Antioxidant Activity of Some Selected Wild Leafy Vegetables of Meghalaya State in India, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(3): 1046-1051;
- Seal, T., K. Chaudhuri et B. Pillai, 2012, Antioxidant Activity of Some Selected Wild Edible Fruits of North. Eastern Region in India and Effect of Solvent Extraction System, *Global Journal of Environmental Research*, 6(3): 84-90;

- Speroni, E., R. Cervellati, S. Costa, S. Dall'Acqua, M.C. Guerra, C. Panizzolo, A. Utan, et G. Innocenti, 2007, Analgesic and anti-inflammatory activity of *Cyclamen repandum* S. et S. *Phytother Res*;21(7):684-9.
- Siddhuraju, P. et K. Becker, 2003, Antioxidant Properties of Various Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera lam.*) leaves. *J. Agric. Food Chem*, 51: 2144-2155 ;
- Skibola, C. F. et M. T. Smith, 2000, Potential Health Impacts of Excessive Flavonoid Intake, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 29, Issues 3–4, Pages 375–383 ;
- Soare, J. R., T. C. P. Dinis, A. P. Cunha et L. Almeida, 1997. Antioxidant Activities of Some Extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, 26 (5): 469-478;
- Stratu, A., N. Costică et O. Pușchiu, 2011, Histo-Anatomical and Physiological Aspects of Plant Species with Flowers Decoration, *Analele științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași Tomul LVII, fasc. 1, s. II a. Biologie vegetală*, pp: 14-15;
- Suja, K. P., A. Jayalekshmy et C. Arumughan, 2005, Antioxidant Activity of Sesame Cake Extract, *Food Chemistry*, 91: 213–219;
- Sugiyama, M., H. Saito, H. Ichida, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Terakawa, et T. Abe, 2008, Biological Effects of Heavy-Ion Beam Irradiation on *Cyclamen*, *Plant Biotechnology* 25, 101–104;
- Sultana, B., F. Anwaret et M. Ashraf, 2009, Effect of Extraction Solvent/Technique on The Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts, *Molecules*, 14, 2167-2180 ;

T

- Takamura, T., M. Aizawa, S. Y. Kim, M. Nakayama et H. Ishizaka, 2005, Inheritance of Flower Pigment in Crosses between *Cyclamen* Cultivars and *Cyclamen purpurascens*, *Acta Hort*, pp: 437-441;
- Tu, S. H, C. C. Chang, C. S. Chen, K. W. Tam, Y. J. Wang, C. H. Lee, H. W. Lin, T. C. Cheng, C. S. Huang, J. S. Chu, N. Y. Shih, L. C. Chen, S. J. Leu, Y. S. Ho et C. H. Wu, 2010, Increased Expression of Enolase α In Human Breast Cancer Cells, *Breast Cancer Res Treat* 121 : 539-553 ;

V

- Verdrager J., 1978, *Ces médicaments qui nous viennent des plantes*. Ed. Maloine S. A, p 45.

Vijayababu, M. R., A. Arunkumar , P. Kanagaraj , P. Venkataraman , G. Krishnamoorthy et J. Arunakaran , 2006, Quercetin Downregulates Matrix Metalloproteinases 2 and 9 proteins Expression In Prostate Cancer Cells (PC-3), *Mol Cell Biochem.* 287(1-2):109-16 ;

W

Wagner, C., R. Fachinetto, C. L. D. Corte, V. B. Brito, D. Severo, G. D. O. C. Dias et A. F. Morel, C. W. Nogueira et J. B. T. Rocha, 2006, Quercitrin, A Glycoside Form of Quercetin, Prevents Lipid Peroxidation *In Vitro*, *Brain Research*, 1107 : 192-198 ;

Wesley, P. S., B. C. Devi, S. Moin et S. Shibu, 2013, *In Vitro* Phytochemical Screening, Free Radical Scavenging Activity And Anticancer Activity Of *Abutilon hirtum* (Lam.) Sweet (Malvaceae), *International Journal of PharmTech Research*, 5(1) : 155-161 ;

X

Xia, E. Q., G. F. Deng, Y. J. Guo et H. B. Li, 2011, "Biological activities of polyphenols from grapes." *International Journal of Molecular Sciences* **11**(2): 622-646.

Y

Yao K., V. De Luca et N. Brisson N, 1995, Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell.* ;7: 1787-1799.

Z

Zellagui, A., N. Gherraf, M. Kaabache et S. Rhouati, 2011, Phytochemical and Biological Survey From Two Endemic Species: *Genista microcephala* Coss et Dur and *Filago pomelli* Batt et Trab, *Plant Sciences Feed*, 1(11): 190-193;

Zi, X, D. K. Feyes et R. Agarwal , 2008, Anticarcinogenic Effect of a Flavonoid Antioxidant, Silymarin, In Human Breast Cancer Cells MDA-MB 468: Induction of G1 Arrest Through An Increase In Cip1/p21 Concomitant With A Decrease In Kinase Activity of Cyclin-dependent Kinases and Associated Cyclins.

Annexes

Annexe n°1 (dosage des polyphénols totaux)

Absorbance de l'acide gallique

Concentrations de l'acide gallique (mgL ⁻¹)	Absorbance (nm)		Moyenne ± SD (nm)
	1 ^{ère} Répétition	2 ^{ème} Répétition	
2.10 ⁻³	0.464	0.512	0,488 ± 0,03
10 ⁻³	0.250	0.272	0,261 ± 0,01
8.10 ⁻⁴	0.227	0.196	0,211 ± 0,02
6.10 ⁻⁴	0.148	0.138	0,143 ± 0,00
4.10 ⁻⁴	0.129	0.101	0,115 ± 0,01
2.10 ⁻⁴	0.057	0.054	0,055 ± 0,00
10 ⁻⁴	0.027	0.031	0,029 ± 0,00

L'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique est:

$$Y = 241.71249 (\pm 5.84135) X + 0.0099 (\pm 0.0055)$$

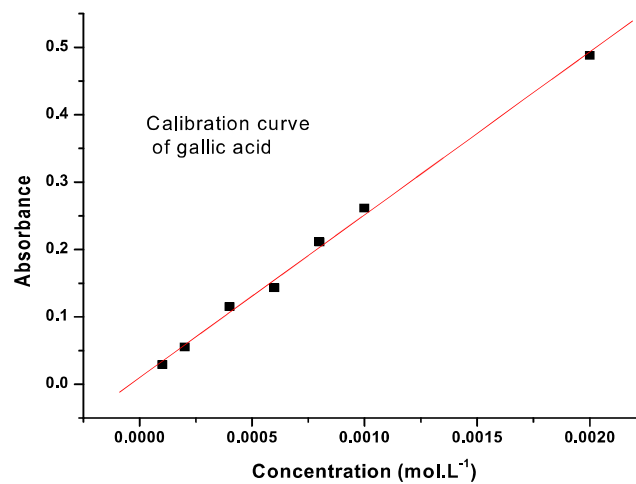


Figure: Droite d'étalonnage des polyphénols totaux

* Les calculs de GAEs par un gramme d'extrait :

$$\text{Absorbance} = 0.0101 + 241.56415 \times \text{concentration (mol. l}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Concentration (mol. l}^{-1}\text{)} = (\text{Absorbance} - 0.0101) / 241.56415$$

Annexe n°2 (l'activité antioxydante) L'extrait MeOH

1 ^{ère} Répétition			2 ^{ème} Répétition		3 ^{ème} Répétition		Moyenne ± SD (%)
Dilutions (mg l ⁻¹)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	
Blanc	0.520	-	0.520	-	0.520	-	-
1000	0.146	71.92	0.163	68.65	0.153	70.75	70.440 ± 1.656
750	0.205	60.75	0.215	58.65	0.186	64.23	61.210 ± 2.818
500	0.269	48.26	0.274	47.30	0.277	46.73	47.430 ± 0.773
250	0.330	36.53	0.332	36.15	0.328	36.92	36.533 ± 0.385
100	0.357	31.34	0.371	28.56	0.371	28.65	29.516 ± 1.579

L'extrait MeOH -eau

1 ^{ère} Répétition			2 ^{ème} Répétition		3 ^{ème} Répétition		Moyenne ± SD (%)
Dilutions (mg l ⁻¹)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	
Blanc	0.520	-	0.520	-	0.520	-	-
1000	0.112	78.64	0.209	59.80	0.237	54.42	64.286 ± 12.718
750	0.224	56.92	0.229	55.96	0.247	52.5	55.126 ± 2.324
500	0.217	58.26	0.309	40.57	0.312	40	46.276 ± 10.380
250	0.297	42.88	0.333	35.96	0.313	39.80	39.546 ± 3.466
100	0.387	25.57	0.406	21.96	0.439	15.57	21.033 ± 5.060

L'extrait DCM

1 ^{ère} Repetition			2 ^{ème} Repetition		3 ^{ème} Repetition		Moyenne ± SD (%)
Dilutions (mg l ⁻¹)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	
Blanc	0.520	-	0.520	-	0.520	-	-
1000	0.381	26.73	0.410	21.15	0.425	18.26	22.046 ± 4.30
750	0.411	20.96	0.417	19.80	0.434	16.53	19.096 ± 2.297
500	0.429	17.5	0.426	18.07	0.428	17.69	17.753 ± 0.290
250	0.427	17.88	0.427	17.88	0.426	18.07	17.943 ± 0.109
100	0.429	17.5	0.437	15.96	0.430	17.30	16.92 ± 0.837

BHT

1 ^{ère} Repetition			2 ^{ème} Repetition		3 ^{ème} Repetition		Moyenne ± SD (%)
Dilutions (mg l ⁻¹)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	
Blanc	0.520	-	0.520	-	0.520	-	-
1000	0.063	87.88	0.062	88.07	0.062	88.07	88.006 ± 0.109
750	0.065	87.5	0.063	87.88	0.066	87.30	87.560 ± 0.294
500	0.074	85.76	0.065	87.5	0.067	87.11	86.790 ± 0.913
250	0.080	84.61	0.090	82.69	0.110	78.84	82.046 ± 2.938
100	0.182	65	0.211	59.42	0.242	53.46	59.293 ± 5.771

Acide gallique

1 ^{ère} Répétition			2 ^{ème} Répétition		3 ^{ème} Répétition		Moyenne ± SD (%)
Dilutions (mg l ⁻¹)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	Absorbance (nm)	Effet scavengeur (%)	
Blanc	0.520	-	0.520	-	0.520	-	-
1000	0.058	88.84	0.057	89.03	0.055	89.42	89.096 ± 0.295
750	0.069	86.73	0.059	88.65	0.060	88.46	87.946 ± 1.057
500	0.058	88.84	0.058	88.84	0.059	88.65	88.776 ± 0.109
250	0.063	87.88	0.060	88.46	0.061	88.26	88.200 ± 0.294
100	0.061	88.25	0.068	86.92	0.062	88.07	87.746 ± 0.721

Annexe n°3 : (activité anticancéreuse)

Extrait DCM

La lignée BT-438, DO 570

Concentrations (µg/ml)	Absorbance (nm)				Moyenne ±SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,860558	0,903991	0,888658	0,848586	0.875448 ± 0.025
100	0,553224	0,670465	0,777243	0,680843	0.670443 ± 0.091
250	0,37217	0,624469	0,786503	0,769522	0.638166 ± 0.191
500	0,403377	0,658781	0,552716	0,435863	0.512684 ± 0.116
1000	0,291015	0,375305	0,304315	0,192507	0.290785 ± 0.075
2000	0,524986	0,390346	0,317082	0,239207	0.367905 ± 0.121

La lignée BT-438, DO 630

Concentrations (µg/ml)	Absorbance (nm)				Moyenne ±SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,283601	0,274454	0,27622	0,255269	0.272386 ± 0.012
100	0,185744	0,222472	0,245371	0,227014	0.220150 ± 0.024
250	0,131266	0,189943	0,226888	0,234477	0.195643 ± 0.047
500	0,141945	0,209573	0,181962	0,150861	0.171085 ± 0.030
1000	0,108161	0,116382	0,12226	0,0695808	0.104095 ± 0.023
2000	0,174039	0,139703	0,135043	0,110681	0.139866 ± 0.026

La lignée MDA-MB-231, DO 570

Concentrations (µg/ml)	Absorbance (nm)				Moyenne ±SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	1,29971	1,48378	1,54562	1,46603	1.448785 ± 0.105
100	1,10181	1,18637	1,21215	1,06558	1.141477 ± 0.069
250	0,9559	1,28247	1,10433	1,0498	1.098125 ± 0.137
500	0,794498	0,878513	1,00504	0,944261	0.905578 ± 0.090
1000	0,310954	0,25622	0,316761	0,335802	0.304934 ± 0.034
2000	0,269071	0,312658	0,302092	0,327069	0.302722 ± 0.024

La lignée MDA-MB-231, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,397691	0,439491	0,456932	0,435673	0,432446 \pm 0.024
100	0,356721	0,385609	0,393924	0,352459	0,372178 \pm 0.020
250	0,314702	0,397355	0,344836	0,328339	0,346308 \pm 0.036
500	0,268538	0,290119	0,335321	0,307852	0,300457 \pm 0.028
1000	0,124136	0,0967515	0,107876	0,122532	0,112823 \pm 0.012
2000	0,119415	0,131631	0,128944	0,136742	0,129183 \pm 0.007

La lignée MCF-10A, DO 570

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,571232	0,809723	0,752651	0,702007	0,708903 \pm 0.101
100	0,575768	0,546646	0,452059	0,50619	0,520165 \pm 0.053
250	0,534246	0,607043	0,599808	0,550966	0,573015 \pm 0.035
500	0,563418	0,686269	0,580383	0,571855	0,600481 \pm 0.057
1000	0,230877	0,376633	0,361822	0,279103	0,312108 \pm 0.069
2000	0,225481	0,45554	0,306059	0,303051	0,322532 \pm 0.069

La lignée MCF-10A, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,19399	0,242767	0,226034	0,214348	0,219284 \pm 0.020
100	0,194502	0,185878	0,159495	0,175381	0,178814 \pm 0.015
250	0,18237	0,186582	0,183812	0,174146	0,181727 \pm 0.005
500	0,19252	0,226876	0,193586	0,19608	0,202265 \pm 0.016
1000	0,0978731	0,127275	0,129528	0,111566	0,116560 \pm 0.116
2000	0,0968703	0,164145	0,1295	0,13913	0,132411 \pm 0.027

Extait MeOH

La lignée BT-438, DO 570

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,774918	0,658372	0,869003	0,842463	0,786189 \pm 0.093
100	0,766927	0,623231	0,603961	0,679643	0,668440 \pm 0.073
250	0,382046	0,5669	0,50922	0,475457	0,483405 \pm 0.077
500	0,32206	0,557762	0,412862	0,351899	0,411145 \pm 0.104
1000	0,512304	0,566111	0,493463	0,457125	0,507250 \pm 0.045
2000	0,323756	0,563077	0,501531	0,553989	0,485588 \pm 0.111

La lignée BT-438, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,244708	0,203091	0,259935	0,265962	0,243424 \pm 0.028
100	0,245066	0,202062	0,198827	0,235055	0,220252 \pm 0.023
250	0,1348	0,165531	0,176179	0,169554	0,161516 \pm 0.018
500	0,116862	0,182707	0,155583	0,133671	0,147205 \pm 0.028
1000	0,16374	0,17054	0,153291	0,15698	0,161137 \pm 0.007
2000	0,11506	0,189794	0,168387	0,184798	0,164509 \pm 0.034

La lignée MDA-MB-231, DO 570

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	1,14682	1,59579	1,44354	1,50536	1,422877 \pm 0.194
100	1,04978	1,14048	1,14105	0,987152	1,079615 \pm 0.075
250	0,321288	0,370943	0,401851	0,461549	0,388907 \pm 0.058
500	0,274364	0,34738	0,312313	0,251625	0,296420 \pm 0.042
1000	0,226213	0,355007	0,353066	0,339892	0,318544 \pm 0.061
2000	0,230458	0,208719	0,220813	0,231762	0,222938 \pm 0.010

La lignée MDA-MB-231, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,363407	0,483696	0,442567	0,451625	0,435323 \pm 0.051
100	0,354288	0,374539	0,383173	0,332781	0,361195 \pm 0.022
250	0,119733	0,123736	0,13075	0,168243	0,135615 \pm 0.022
500	0,105295	0,127341	0,116296	0,0983698	0,111825 \pm 0.012
1000	0,0882784	0,115412	0,115347	0,111834	0,107717 \pm 0.013
2000	0,0934721	0,0864084	0,0898996	0,0966245	0,091601 \pm 0.004

La lignée MCF-10A, DO 570

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,661468	0,76642	0,773835	0,740776	0,735624 \pm 0.051
100	0,475963	0,772278	0,807741	0,587889	0,660967 \pm 0.156
250	0,334543	0,434705	0,34266	0,350825	0,365683 \pm 0.046
500	0,21405	0,295703	0,28433	0,258449	0,263133 \pm 0.036
1000	0,28219	0,376138	0,427904	0,371872	0,364526 \pm 0.060
2000	0,29234	0,381475	0,204945	0,304572	0,295833 \pm 0.072

La lignée MCF-10A, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,211792	0,2279	0,238	0,237306	0,228749 \pm 0.012
100	0,162654	0,250609	0,339236	0,204553	0,239263 \pm 0.075
250	0,119765	0,135279	0,138274	0,157736	0,137763 \pm 0.015
500	0,0836586	0,124933	0,114358	0,104681	0,106907 \pm 0.017
1000	0,104834	0,120145	0,132342	0,118002	0,118830 \pm 0.011
2000	0,110573	0,13511	0,0842171	0,115145	0,111261 \pm 0.020

Extrait MeOH-H₂O

La lignée BT-438, DO 570

Concentrations (µg/ml)	Absorbance (nm)				Moyenne ±SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,846031	0,795688	0,741866	0,612356	0,748985 ± 0.100
100	1,00873	1,0355	0,920107	0,894882	0,964804 ± 0.067
250	0,975266	0,65411	0,838127	0,801701	0,817301 ± 0.131
500	0,844026	0,778436	0,855651	0,669462	0,786893 ± 0.085
1000	0,516672	0,489641	0,584674	0,586563	0,544387 ± 0.048
2000	0,424592	0,470303	0,489434	0,648361	0,508172 ± 0.097

La lignée BT-438, DO 630

Concentrations (µg/ml)	Absorbance (nm)				Moyenne ±SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,257499	0,249191	0,226338	0,195302	0,232082 ± 0.027
100	0,322222	0,334105	0,293377	0,282235	0,307984 ± 0.024
250	0,299438	0,206262	0,252321	0,24282	0,250210 ± 0.038
500	0,310944	0,265822	0,271245	0,227741	0,268938 ± 0.034
1000	0,190009	0,168223	0,243515	0,18162	0,195841 ± 0.033
2000	0,153948	0,171967	0,169744	0,242032	0,184422 ± 0.039

La lignée MDA-MB-231, DO 570

Concentrations (µg/ml)	Absorbance (nm)				Moyenne ±SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	1,43823	1,70754	1,26512	1,13711	1,387000 ± 0.246
100	1,28752	1,17814	1,23218	1,2994	1,249310 ± 0.055
250	1,31606	1,51326	1,43016	1,39011	1,412397 ± 0.082
500	0,733459	0,611293	0,73749	0,67085	0,688273 ± 0.059
1000	0,322385	0,31539	0,20222	0,228429	0,267106 ± 0.060
2000	0,280422	0,377327	0,269847	0,233918	0,290378 ± 0.061

La lignée MDA-MB-231, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,445202	0,528977	0,391348	0,349725	0,428813 \pm 0.077
100	0,414835	0,384269	0,395116	0,404217	0,399609 \pm 0.013
250	0,406847	0,46944	0,43424	0,422296	0,433205 \pm 0.026
500	0,239142	0,206649	0,24159	0,214764	0,225536 \pm 0.017
1000	0,109683	0,11023	0,0731835	0,0795151	0,093152 \pm 0.019
2000	0,111503	0,133203	0,106104	0,0928003	0,110902 \pm 0.016

La lignée MCF-10A, DO 570

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,811463	0,831072	0,816015	0,720662	0,794803 \pm 0.050
100	0,658704	0,715451	0,634833	0,644936	0,663481 \pm 0.036
250	0,71927	0,715351	0,804053	0,735648	0,743580 \pm 0.041
500	0,663261	0,654578	0,629238	0,698492	0,661392 \pm 0.028
1000	0,271267	0,23992	0,247203	0,44497	0,300840 \pm 0.097
2000	0,28086	0,403384	0,328266	0,445364	0,364468 \pm 0.073

La lignée MCF-10A, DO 630

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (nm)				Moyenne \pm SD (nm)
	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	4 ^{ème} répétition	
0	0,289431	0,258305	0,245732	0,224292	0,254440 \pm 0.027
100	0,218095	0,237774	0,215831	0,214246	0,221486 \pm 0.010
250	0,226327	0,233127	0,256024	0,230625	0,236525 \pm 0.013
500	0,228613	0,232084	0,212391	0,223525	0,224153 \pm 0.008
1000	0,116717	0,102367	0,0917726	0,185987	0,124210 \pm 0.042
2000	0,132414	0,211632	0,14976	0,154255	0,162015 \pm 0.034