



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et
Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de sciences biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**Effet thérapeutique de la pervenche de
Madagascar (*Catharanthus roseus*) sur la leucémie aigue
lymphoblastique**

Soutenu le 13/07/2021

Présenté par :

DJILLALI Ahlem

REKROUK Zahia

Devant le Jury :

Mme BELKHITER S

MAA

SNV, Blida1

Présidente

MmeKADRIF

MCB

SNV, Blida1

Examinatrice

Mme MOKRANE A

MCB

SNV, Blida1

Promotrice

MmeNADJI S

Maitre de stage

***Inst.IshakIbnHonain
Boufarik- Blida***

Co-Promotrice

Session 2020/ 2021

Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **Allah**, le bon Dieu de nous avoir donné santé et volonté pour terminer ce travail.*

*Nous remercions **Mme Mokrane A**, notre promotrice, pour avoir dirigé avec une disponibilité permanente et pour tous les efforts qu'elle a consentis tout au long de l'élaboration de ce modeste travail, ses orientations, ses encouragements, ses précieux conseils, sa gentillesse et la confiance qu'elle nous a toujours témoignée nous ont été d'une très grande utilité. Qu'elle trouve ici l'expression de profond respect.*

*On remercie notre Co-promotrice **Mme NADJI S** pour sa confiance, sa aide, ses orientations et toute l'équipe de l'institut **ISHAK IBN HONAIN**.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos remerciements aux membres de jury : **Mme Belkhit** et **Mme KADRI** pour nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail.*

*Nous profond respect et remerciement s'adresse à notre chef d'option **Mme SAADI L***

Nos remerciements vont à l'ensemble de nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie qui ont accepté de partager leurs connaissances durant notre cursus.





Dédicace

Je tiens a dédié ce Modest travail :

*A mon père **YOUCEF** l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui a toujours répandu présent dans les moments les plus difficiles, son soutien, son encouragement m'ont toujours donné la force de poursuivre mes études.*

*A ma mère **ZOULIKHA** pour son amour, et qu'elle m'a toujours accordé en témoignage de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices et sa tendresse, tu es pour moi un exemple de courage.*

*A mes deux frères **ZINO** et **SOUFIEN** et ma sœur **SOURAYA** qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.*

*A mon neveu **Iyad** qui lui souhaite le meilleur dans sa vie*

*A mon très chère binôme **AHEM** pour sa sympathie, pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet et à toute sa famille.*

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.

A l'ensemble des étudiantes de la promotion master 2 BMC 2020/2021.

ZAHIA



Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

*Mon père **Ahmed**, pour ses encouragements, son soutien, ses efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de votre sacrifice que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.*

*Ma très cher mère **CHABANNE Fouzia**, qui me donne toujours l'amour, l'espoir et le courage de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.*

*Mon mari **Oussama**... Mon âme sœur et la lumière de ma vie. Merci pour ton aide précieuse sur ce travail, ta compréhension et ton encouragements, merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières minutes. Merci d'être là tous les jours et être toujours à mes cotés pour traverser ces étapes de ma vie.*

Mon bébé, le plus beau don de dieu, qui n'est pas encore né, et qui est avec moi tout au long de ce travail. Je t'aime énorme.

*Ma sœur **Kawther** et mon frère **Mohamed**.*

Toutes les personnes de ma grande famille, plus particulièrement, mes grands-parents, mes tentes, et mes cousines.

*Mes meilleures amies **María, Imène, Bouchra, Radjaa, et Wafaa**.*

*Mon très cher binôme **Zahia** avec qui j'ai partagée les bons et les durs moments.*

Ahlem

RESUME

La leucémie aiguë lymphoblastique est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité liées au cancer dans le monde, la leucémie aiguë lymphoblastique est une tumeur maligne issues de la transformation oncogénique des progéniteurs hématopoïétiques, provoqué par la multiplication de lymphocytes défectueux dans la moelle osseuse appelés blastes ou dans d'autres organes est responsable d'une insuffisance médullaire et/ou d'un syndrome tumoral et/ou d'un syndrome infiltratif.

Malgré les progrès dans le diagnostic et le traitement de la leucémie, la survie des patients ne s'est améliorée que modestement au cours des dernières années, une nouvelle stratégie est en train d'adopter l'empêchement de la formation des faisceaux mitotiques et donc, l'arrêt de la mitose des cellules cancéreuses.

L'utilisation de la plante médicinale, *Catharanthus roseus* peut conduire à l'arrêt de la mitose des cellules cancéreuses et en association avec plusieurs mélanges de plantes médicinales peut conduire à une guérison complète de cette maladie.

Nous avons pour objectif principal est de caractériser les activités biologiques de *Catharanthus roseus*. et étudier l'effet des principaux alcaloïdes sur les cellules cancéreuses et leurs rôles dans la chimiothérapie.

Il s'agit d'une étude prospective sur une période allant du 07/03/2020 au 30/06/2020 au niveau de l'institut Ishak Ibn Honain de Boufarik- Blida. Nous avons effectué une extraction de l'extrait brut de *Catharanthus roseus* par broyage, suivi par le criblage phytochimique et caractérisation des activités biologiques de *Catharanthus roseus*.

Nos résultats ont montré que la pervenche possède plusieurs principes actifs anti-inflammatoires, antibactériens, antioxydants, et anti-mitotiques très importants. Les résultats de Gidding et al, (1999) montrent l'efficacité de la vincristine en chimiothérapie antimitotique dans la leucémie aiguë lymphoblastique et Albershardt et al, (2011) ont montré l'efficacité de la vinblastine dans l'apoptose des cellules cancéreuses.

La vincristine et vinblastine ont montré leur pouvoir formidable dans la phytothérapie sur les cellules cancéreuses par blocage de la mitose, empêchant la formation des faisceaux mitotiques.

Mots clés : leucémie aiguë lymphoblastique, criblage phytochimique, *Catharanthus roseus*, vinblastine, vincristine.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia is one of the leading causes of cancer-related morbidity and mortality in the world, acute lymphoblastic leukemia is a malignant tumor resulting from the oncogenic transformation of hematopoietic progenitors, causing the multiplication of defective lymphocytes in the marrow bone called blasts or in other organs is responsible for bone marrow failure and / or tumor syndrome and / or infiltration syndrome.

Despite advances in the diagnosis and treatment of leukemia, patient survival has improved only modestly in recent years; a new strategy is adopting prevention of mitotic bundle formation and hence, stopping cancer cell mitosis.

The use of the medicinal plant, *catharanthus roseus* can lead to the cessation of mitosis of cancer cells and in combination with several herbal mixtures can lead to a complete cure of this disease.

Our main objective is to characterize the biological activities of *catharanthus roseus*. and to study the effect of the main alkaloids on cancer cells and their roles in chemotherapy. This was a prospective study covering a period from 07/03/2020 to 30/06/2020 at the level of the Ishak Ibn Honain Institute in Boufarik-Blida. We performed extraction of the raw extract of *catharanthus roseus*. by grinding, followed by phytochemical screening and characterization of biological activities of *catharanthus roseus*.

Our results showed that *catharanthus roseus* has several very important anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant and anti-mitotic active ingredients. The results of Gidding et al, (1999) show the efficacy of vincristine in antimitotic chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia and Albershardt et al, (2011) have shown the efficacy of vinblastine in the apoptosis of cancer cells.

Vincristine and Vinblastine have shown their tremendous power in herbal medicine on cancer cells by blocking mitosis, preventing the formation of mitotic bundles.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, phytochemical screening, *catharanthus roseus*, vinblastine, vincristine.

ملخص

ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد هو أحد الأسباب الرئيسية للمرض والوفيات المرتبطة بالسرطان في العالم، ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد هو ورم خبيث ناتج عن التحول السرطاني لأسلاف المكونة للدم، مما يتسبب في تكاثر الخلايا الليمفاوية المعيبة في نخاع العظام تسمى النخاع أو في الأعضاء الأخرى مسؤولة عن فشل نخاع العظام و / أو متلازمة الورم و / أو متلازمة الارتشاح .

على الرغم من التقدم في تشخيص سرطان الدم وعلاجه، إلا أن بقاء المريض على قيد الحياة قد تحسن بشكل متواضع فقط في السنوات الأخيرة، وهناك استراتيجية جديدة تعتمد الوقاية من تكوين الحزمة الانقسامية وبالتالي إيقاف انقسام الخلايا السرطانية. يمكن أن يؤدي استخدام النبات الطبي العنقاوية الوردية إلى وقف انقسام الخلايا السرطانية ويمكن أن يؤدي بالاشتراك مع العديد من الخلطات العشبية إلى علاج كامل لهذا المرض .

هدفنا الرئيسي هو توصيف الأنشطة البيولوجية للعنقاوية الوردية ودراسة تأثير القلويدات الرئيسية على الخلايا السرطانية ودورها في العلاج الكيميائي. كانت هذه دراسة استطلاعية تغطي الفترة من 07 / 03 / 2020 إلى 30 / 06 / 2020 على مستوى معهد اسحاق ابن حنين ببوفاريك - البليلة. أجرينا استخراج المستخلص الخام من العنقاوية الوردية . عن طريق الطحن، متبوعًا بالفحص الكيميائي النباتي وتوصيف الأنشطة البيولوجية للعنقاوية الوردية.

أظهرت نتائجنا أن العنقاوية الوردية تحتوي على العديد من المكونات النشطة المضادة للالتهابات والمضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة والمضادة للانقسام. أظهرت نتائج Gidding et al (1999) فعالية الفينكريستين في العلاج الكيميائي المضاد في سرطان الدم الليمفاوي الحاد وأظهر ألبيرشاردت وآخرون (2011) فعالية فينبلاستين في موت الخلايا المبرمج للخلايا السرطانية .

أظهر فينكريستين وفينبلاستين قوتها الهائلة في الطب العشبي على الخلايا السرطانية عن طريق منع الانقسام، ومنع تكوين الحزم الانقسامية .

الكلمات المفتاحية: ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد، الفحص الكيميائي النباتي. العنقاوية الوردية. فينبلاستين، فينكريستين

Liste des abréviations

B-ALL: Lymphome Lymphoblastique B

CALM-AF10 :Gène de fusion CALM-AF10

CCMH :Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CDKN2A/B :Gènes inhibiteurs de la Kinase Cycline-Dépendante 2A/B

CGSH : Greffe de Cellule Souche Hématopoïétique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

c-MYC :Proto-oncogène

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

IKZF1 : Ikaros zinc finger protein 1

IL7R : Recepteur de l'Interleukin -7

IM : Insuffisance Médullaire

JAK1 : Janus Kinase 1

KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LNH:Lymphomes Non Hodgkiniens

MGG:MayGrünwald-Giemsa

MLL: Mixed-Lineage Leukemia

MPO:Myéloperoxydases

Notch1:Neurogenic Locus Notch Homolog Protein1

NRAS: Proto-oncogène de la famille RAS

PAX5: Paired Box Protein 5

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

RB1:Retinoblastoma 1

RFD : Réactif de Folin-Denis

RUNX1: Runt-Related Transcription Factor 1

LTL : Lymphome T Lymphoblastique

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

TCR : T CellReceptor

TLX1 : T cell Leukemia homeobox 1

TP53 : TumorProtein 53

VGM : Volume Globulaire Moye

Liste Des Figures

| | |
|--|-----|
| Figure1 :Hématopoïèse..... | P5 |
| Figure2 : Le mécanisme de la leucémie..... | P6 |
| Figure3 : Principales altérations génétiques observées dans les leucémies aiguës..... | P8 |
| Figure4 : La pervenche de Madagascar..... | P15 |
| Figure5 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de la pervenche de Madagascar. A : la vinblastine, B : la vincristine..... | P16 |
| Figure6 : Mécanisme d'action des vincaalcaloïdes..... | P19 |
| Figure7 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux..... | P29 |
| Figure8 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins totaux... | P30 |
| Figure9 : Courbe d'étalonnage de la quercétinepour le dosage des flavonoïdes..... | P31 |
| Figure10 : Chromatogramme d'HPLC de la pervenche enregistrée à 350 nm..... | P32 |
| Figure11 : Pourcentage de piégeage de radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la pervenche..... | P33 |
| Figure12 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de la pervenche..... | P34 |

Liste Des Tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau I : Programme de l'élution..... | P27 |
| Tableau II : Criblage phytochimique de la pervenche..... | P28 |
| Tableau III : Teneur de la pervenche en composés phénolique des extraits méthanolique et en tanins totaux..... | P30 |
| Tableau IV : Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques..... | P31 |
| Tableau V : Séparation des flavonoïdes de la pervenche..... | P32 |
| Tableau VI : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50%(IC50)de l'activité antioxydante..... | P33 |
| Tableau VII : Valeur des concentrations inhibitrice à 50%(IC50)de l'activité anti inflammatoire..... | P34 |
| Tableau VIII : Sensibilité et CMI (mg/ml)des souches bactériennes testés aux extraits méthanolique de la pervenche..... | P35 |

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | |
| I- Généralités sur la leucémie aigüe lymphoblastique..... | 3 |
| I.1- Définition..... | 3 |
| I.2- Epidémiologie..... | 4 |
| I.3- Etiologie des leucémies aigües lymphoblastiques..... | 4 |
| I.4- Physiologie et physiopathologie..... | 5 |
| I.5- Diagnostic..... | 8 |
| I.6- Traitements..... | 12 |
| I.6.1- La radiothérapie..... | 12 |
| I.6.2- La greffe de cellules souches..... | 12 |
| I.6.3- La chimiothérapie..... | 12 |
| II. La Pervenche de Madagascar | 13 |
| II.1. Définition..... | 13 |
| II.2. Description botanique..... | 14 |
| II.3. Compositions chimiques de la pervenche de Madagascar..... | 15 |
| II.4. Principaux alcaloïdes de la pervenche de Madagascar..... | 16 |
| II.5. Propriétés thérapeutiquesde la Pervenche de Madagascar..... | 17 |
| II.6. Mécanisme d'action de la pervenche de Madagascar..... | 18 |
| II.6.1. L'effet de vincristine et vinblastine sur la leucémie aigüe lymphoblastique..... | 19 |
| II.7. Mode d'administration de la vincristine et la vinblastine..... | 20 |
| | 21 |
| CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES | |
| II.1. Matériel..... | 21 |
| II.1.1. Matériel biologique..... | 21 |
| II.1.2. Matériel non biologique..... | 22 |
| II.2. Méthodes..... | 22 |
| CHAPITRE III : RESULTATS | 28 |
| CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS..... | 36 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 39 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| ANNEXES | |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Laleucémie aigüe lymphoblastique est la forme de leucémie la plus courante. Elle est une hémopathie maligne, caractérisée par une prolifération clonale intra médullaire de cellules hématopoïétiques anormales, dont le processus de maturation est bloqué à un stade précoce de sa différenciation.

L'accumulation de cellules anormales (blastes) dans la moelle ou dans d'autres organes est responsable d'une insuffisance médullaire et/ou d'un syndrome tumoral et/ou d'un syndrome infiltratif.

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est moins fréquente chez l'adulte. Elle représente environ 20% des leucémies aiguës, mais avait un pronostic plus sévère avec des survies longues dans moins de 10% des cas. Chez l'enfant, elle est plus fréquente, et elle représente 80% des leucémies, et 30% des cancers infantiles (**Kampen, 2012**).

Son étiologie est le plus souvent inconnue.

Le diagnostic de LAL ne peut plus reposer aujourd'hui sur les études morphologiques et cytochimiques, mais doit inclure le phénotype immunologique des cellules leucémiques. Actuellement, une classification, basée sur des données immunophénotypiques et cytogénétiques, ainsi que sur des données de la biologie moléculaire, est nécessaire pour la détermination du traitement optimal.

Le traitement de la LAL se fait par phases et comprend le traitement par la chimiothérapie et d'autres formes de thérapies. Le plan de traitement varie en fonction du sous-type de leucémie, de la cytogénétique, les études moléculaires, ainsi que l'âge du patient.

Le recours à la phytothérapie connaît un essor important auprès des populations. Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps pour soigner de nombreuses maladies et différentes formes de cancer. Dans les années 1950, il a été mis en évidence l'activité antitumorale des extraits de la pervenche de Madagascar « *Catharanthus roseus* » (**Noble, 1990**). L'étude de ces extraits a permis d'identifier deux alcaloïdes indoliques dimères : la vinblastine et la vincristine, commercialisées sous les noms de Velbé® et Oncovin® (**Benjamin, 2017**).

La vincristine cause la mort des cellules cancéreuses et la vinblastine encourage mécaniquement le détachement de l'extrémité négative des microtubules de leurs centres organisationnels ; cela génère des fragments de microtubules, elles sont utilisées aussi dans

INTRODUCTION

le traitement de divers cancers, y compris les leucémies, et peuvent être mélangées à d'autres agents chimiothérapeutiques (Chanez, 2018).

Notre étude consiste à caractériser des activités biologiques de la pervenche et l'utilisation de cette plante dans la chimiothérapie, avec comme objectifs :

Nous avons effectué une extraction de la teinture mère de la pervenche par broyage, suivi par le criblage phytochimique et caractérisation des activités biologiques de la pervenche.

- Etudier l'effet des alcaloïdes sur les cellules cancéreuses.
- Définir le rôle des principes actifs dans la leucémie lymphoblastique aigüe ;
- Déterminer les différentes méthodes de caractérisation de la pervenche ;
- Prouver l'efficacité de la vincristine et la vinblastine, pour guérir la leucémie lymphoblastique aigüe.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons :

- Fait une recherche bibliographique générale sur la leucémie lymphoblastique aigüe et la pervenche ;
- Manipulé la technique d'extraction de la pervenche et chromatographie (HPLC) ;
- Analysé les résultats de calibrage phytochimique.

Notre étude comporte trois chapitres. Dans le premier, nous rapportons des rappels bibliographiques sur la leucémie aigüe lymphoblastique et l'implication de la pervenche dans la thérapie de cette maladie. Nous décrivons le matériel et les techniques utilisés dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième et quatrième chapitre.

A la fin, une conclusion et des perspectives sont présentées.

CHAPITRE I :
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I-Généralité sur les leucémies aiguës

Les leucémies aiguës représentent un groupe d'hémopathies malignes issues de la transformation oncogénique des progéniteurs hématopoïétiques. Il s'agit d'un ensemble d'entités très hétérogène, marqué au premier plan par l'insuffisance médullaire plus rarement par un syndrome tumoral.

Une leucémie aiguë correspond à un envahissement de la moelle osseuse par des cellules tumorales (blastes) supérieur à 20% (**Cécile et Pierre, 2015**) ; par ailleurs, il existe un déficit de production de cellules matures, d'où l'installation d'un tableau d'insuffisance médullaire associant une neutropénie fébrile, un syndrome anémique et un syndrome hémorragique, et leurs conséquences cliniques (**Valensi, 2003 ; Haferlach et al., 2005**).

Deux grands types de leucémies aiguës sont définies en fonction de l'origine du précurseur hématopoïétique atteint (**Ribera, 2011 ; Farnault et Baccini, 2015**) :

1- Leucémies aiguës myéloïdes (LAM) : les cellules blastiques sont : myéloblastes, monoblastes, érythroblastes ou mégacaryoblastes.

2- Leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) : les cellules blastiques sont des lymphoblastes.

I.1- Définition

La leucémie aiguë lymphoblastique est une hémopathie maligne, caractérisée par une prolifération clonale intra médullaire de cellules hématopoïétiques anormales, dont le processus de maturation est bloqué à un stade précoce de sa différenciation (**Passweg et al., 2008**).

L'accumulation de cellules anormales (blastes) dans la moelle ou dans d'autres organes est responsable d'une insuffisance médullaire et/ou d'un syndrome tumoral et/ou d'un syndrome infiltratif (**Passweg et al., 2008**).

Les néoplasies lymphoïdes précurseurs sont globalement classées en fonction de leur lignée (**Ashkan et al., 2020**) :

- Leucémie/lymphome B-lymphoblastique (B-ALL/LBL) : lorsque ce sont des cellules immatures lymphoïdes B qui prolifèrent.
- Leucémie/lymphome T-lymphoblastique (T-ALL/LTL) : qui consiste en une prolifération de cellules immatures de la lignée lymphoïde T.

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.2- Epidémiologie

Selon le groupe européen RARE Care, les leucémies aiguës sont des cancers rares, représentent 10 et 15 % des hémopathies malignes et 1 % de l'ensemble des cancers dans le monde (Maynadié et Troussard, 2015). Les leucémies aiguës, lymphoïdes et myéloïdes représentent 10 à 15 % des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale et incontrôlée de précurseurs hématopoïétiques bloqués dans leur différenciation (Vardiman et al., 2009).

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) a une incidence proche de 1,5/100 000 habitants/an, qui se rencontre plus fréquemment chez l'enfant, elle représente 80% des leucémies, et 30% des cancers infantiles. Le pronostic de cette maladie est meilleur chez l'enfant avec une survie à 5 ans de 90 % chez l'enfant alors qu'elle n'est que de 35 à 40 % chez l'adulte, représentant un pronostic plus sévère (Passweg et al., 2008 ; Marc et al., 2015).

I.3- Etiologie de la leucémie aiguë lymphoblastique

Dans la majorité des cas, la cause de la leucémie reste inconnue, mais des facteurs étiologiques peuvent favoriser le développement de la maladie.

I.3.1- Facteurs génétiques

Ces anomalies génétiques acquises sont généralement les trois mécanismes de la transformation maligne qui sont identifiées à partir d'anomalies chromosomiques (Bousquet, 2008) :

- L'expression anormale des gènes normaux.
- L'expression des gènes anormaux soit par mutation, soit par fusion entre deux gènes.
- La disparition des gènes (gènes suppresseurs de tumeur), qui contrôlent le processus mutagène.

I.3.2- Facteurs environnementaux

Plusieurs auteurs ont souligné le rôle joué par certains facteurs environnementaux dans la survenue de la maladie notamment chez les travailleurs dans les stations de benzène, et d'essences. Certaines peintures et vernis, surtout les produits celluloseux qui sont utilisés pour le bois, les métaux, et les cuirs, et les métiers de l'agro-alimentaire chargés de la stérilisation des aliments comme les légumes déshydratés, viandes séchées, et la poudre d'œufs qui est particulièrement bien décrit dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (Brugère, 2006 ; Ngamaïoli, 2010).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

De nombreuses études soulignent l'importance possible des autres facteurs physiques comme exposition aux radiations ionisantes, électromagnétiques, utilisation d'appareils de radiodiagnostic et de radiothérapie, mesures des radioactives et des rayons X qui sont utilisés pour l'enseignement et la recherche (dans les laboratoires de physique et chimie) favorisent le risque de LAL (Brugère *et al.*, 2006).

I.4- Physiologie et physiopathologie

I.1.4- Hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble de mécanismes qui assurent le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines. Cette activité de production a pour origine une cellule souche commune totipotente qui va se différencier vers la voie myéloïde ou vers la voie lymphoïde (Féger, 2017) (Figure 01).

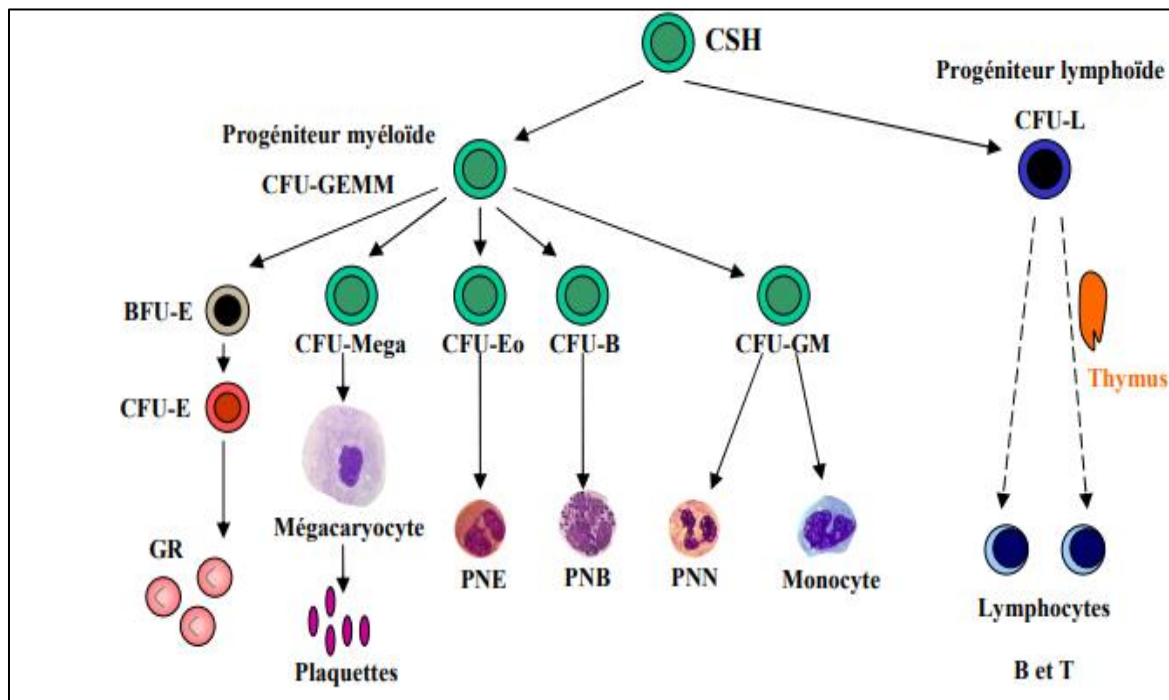


Figure01 :Hématopoïèse(Féger,2017)

L'hématopoïèse doit être contrôlée afin de maintenir le nombre des cellules sanguines malgré les variations de consommation importantes liées à des circonstances physiologiques (infections, hémorragies...). Cette régulation repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux (facteurs de croissance, interleukines) qui peuvent être stimulateurs ou inhibiteurs de l'hématopoïèse (Féger, 2017).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.2.4- Physiopathologie de la leucémie aigüe lymphoblastique

Les cellules de l'organisme, à l'exception des neurones, ont un cycle de vie relativement court, de quelques jours à plusieurs semaines ou mois selon le type de la cellule. Au cours de la leucémie aigüe, il y'a une transformation maligne d'une cellule devenue incapable de se différencier en réponse aux stimuli physiologique normaux. Cette même cellule se multiplie indéfiniment donnant naissance à un clone leucémique, ce qui engendre une accumulation de cellules blastiques dans la moelle osseuse, ce qui entraîne une défaillance de l'hématopoïèse normale. En effet, la LAL se caractérise dans un premier temps par l'apparition de mutations somatiques à l'intérieur d'une cellule de la lignée des progéniteurs lymphoïdes médullaires. Cette cellule peut subir une transformation maligne et peut générer une population monoclonale de précurseurs lymphoïdes immatures (lymphoblastes pré-B ou pré-T). Cette population de précurseurs lymphoïdes va progressivement envahir la moelle osseuse et entraîner une insuffisance médullaire en perturbant l'hématopoïèse polyclonale normale (Mullighan *et al.*, 2007)(Figure 02).

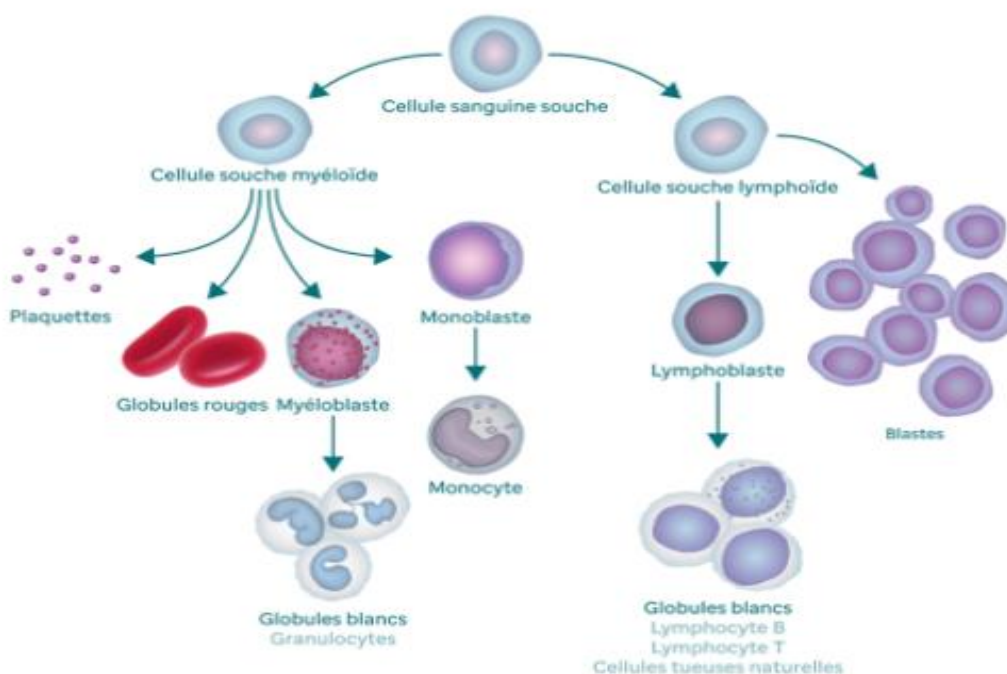


Figure 02 : Le mécanisme de la leucémie. La LAL touche les globules blancs nommés lymphocytes. la moelle osseuse des patients atteints de LAL contient trop de globules blancs immatures (les blastes). Ces cellules ne fonctionnent pas normalement. Elles remplacent les globules blancs normaux, les globules rouges et les plaquettes.

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

➤ Les mutations génétiques

Deux grands types d'anomalies sont distinguées, selon qu'elles touchent des oncogènes de type 1 ou de type 2 (**Van Vlierberghe et al., 2008 ; Van der Meulen et al., 2014**).

- ✓ Les anomalies de type 1 sont corrélées à un stade d'arrêt de maturation des lymphocytes T. Ces anomalies seraient responsables du blocage de maturation à des stades spécifiques du développement des lymphocytes T. Elles sont mutuellement exclusives et probablement fondatrices (**Van Vlierberghe et al., 2008 ; Van der Meulen et al., 2014**).

Différents sous-groupes cytogénétiques et moléculaires, impliquant TAL/LMO, c-MYC, HOXA, TLX1, TLX3, sont distingués en tenant compte également du profil d'expression transcriptionnel associé. (**Van Vlierberghe et al., 2008 ; Van der Meulen et al., 2012 ; Soulier et al., 2015 ; Clappier et al., 2017**). Le sous-groupe des gènes HOXA, HOXA est peut-être dérégulé par la présence des transcrits de fusion impliquant MLL, CALM-AF10 ou SETNUP214, ou par une translocation avec les loci du TCR (**Ben Abdelali et al., 2013 ; Zhou et al., 2014**).

- ✓ Les anomalies de type 2 ne sont pas corrélées à un stade précis de maturation. Plus de 30 d'entre elles sont actuellement décrites.

Ces anomalies correspondent souvent à des lésions impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'auto-renouvellement, dans la voie de signalisation du TCR dans la différenciation T, Elles peuvent induire l'activation des tyrosines kinases avec en conséquence une prolifération et/ou une survie excessive. Ces anomalies agissent en synergie dans le processus de transformation, La perte de CDKN2A/B et les anomalies de la voie de signalisation de Notch1 constituent les lésions oncogènes les plus prédominantes (**Van Vlierberghe et al., 2008 ; Mullighan, 2012 ; Van Vlierberghe et al., 2013 ; Ben Abdelali et al., 2013 ; Mullighan, 2014 ; Zhou et al., 2014**). Dans ces LAL T, l'inactivation génomique homozygote ou hétérozygote des loci CDKN2A et CDKN2B est l'anomalie la plus fréquente avec une incidence d'environ 90% (**Sanghvi et al., 2014**).

La dérégulation de la voie Notch1 a été découverte par l'étude de la translocation t(7;9)(**Preston et al., 1994 ; Kim et al., 2016**), laquelle implique le récepteur Notch1 et le TCR β (**Ellisen et al., 1991**). Des mutations de Notch1 sont désormais identifiées dans 50 à 60 % des LAL T, soit une mutation touchant le domaine d'hétérodimérisation, soit une mutation affectant le domaine PEST, des mutations plus rares peuvent affecter le domaine juxta-membranaire ou le domaine de trans-activation (**Mullighan, 2009 ; Tzoneva et al., 2012**).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Les mutations de Notch1 sont couplées avec les mutations du gène FBXW7 qui appartient à la famille de E3 ligase et permet la poly-ubiquitination de Notch1 ainsi que sa dégradation par le protéasome(**Figure 03**). Les mutations de FBXW7 sont retrouvées dans environ 10 % des LAL T (**Thompson et al., 2007 ; O'Neil et al., 2007**). Les mutations de Notch1 et/ou FBXW7 portent la dérégulation de cette voie dans environ 70 % des LAL-T (**O'Neil et al.,2007 ; Aifantis et al.,2008 ; Asnafi et al., 2009 ; Paganin et al., 2011**).

➤ Autres mutations

De nombreuses autres mutations sont décrites, parmi lesquelles des altérations de facteurs de transcription tel que RUNX1 ou ZEB2, des mutations de médiateurs de la voie Ras tels que IL7R, JAK3, JAK1, KRAS, and NRAS, des mutations de PTEN impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de mutations de régulateurs épigénétiques. Ces lésions ont une fréquence variable selon le stade auquel la maturation est bloquée. L'implication de miARN et de large ARN non-codant intergéniques, et ARN non codants. Les miARN coopèrent notamment avec les mutations de Notch, et PTEN (**Figure 03**)(**Paganin et al.,2011 ; Kumar et al., 2014 ; Sanghvi et al., 2014 ; Durinck et al., 2015**).

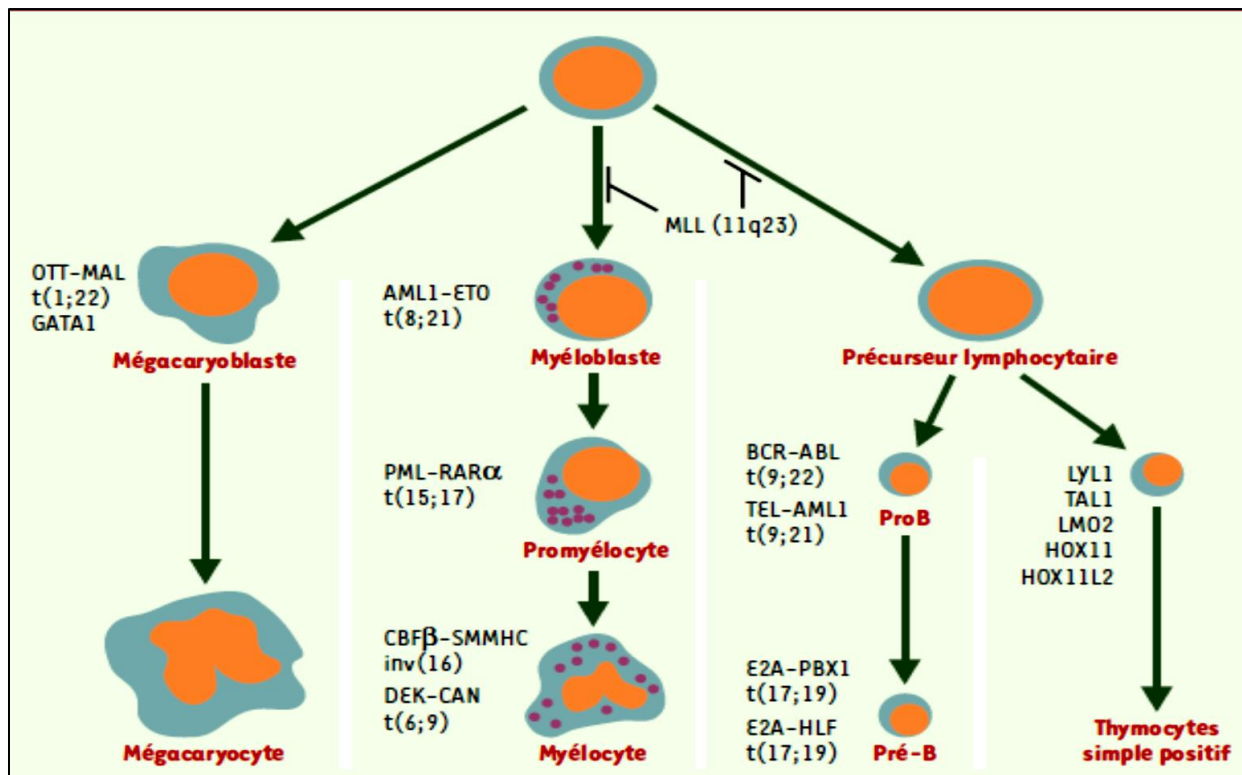


Figure 03 : Principales altérations génétiques observées dans les leucémies aiguës (**Hunger et al., 2015**)

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.5- Diagnostic

I.5.1-Diagnostic clinique

L'expression clinique est déterminée par deux processus : l'insuffisance médullaire (IM) et le syndrome tumoral.

- **Les signes d'insuffisance médullaire** sont le résultat de l'insuffisance de production par la moelle des éléments sanguins normaux, du fait de son envahissement par des cellules blastiques et/ou l'arrêt de différenciation de cellules qui peuvent être progénitrices de la lignée lymphoïde dans la LAL ou de la lignée myéloïde dans la LAM (Liesner et al., 2001).

Le tableau clinique comporte de façon plus ou moins complète :

- ✓ **Le syndrome anémique:** peut s'exprimer par une pâleur généralisée, cutanéomuqueuse d'importance variable, une asthénie importante, des vertiges et/ou palpitations, et un souffle systolique fonctionnel à l'auscultation.
- ✓ **Le syndrome infectieux :** présent dans 50% des cas, se manifestant par une fièvre modérée (38,5°C) avec ou sans foyer cliniquement décelable. Les sites cliniques infectieux les plus fréquents sont la bouche (mucites), la sphère oto-rhino-laryngologique (angines, otites), la peau (abcès), la région périnéale et le poumon. Ces infections sont très fréquentes si la neutropénie est inférieure à 500 éléments/mm³ (Société française d'hématologie, 2006).
- ✓ **Le syndrome hémorragique :** est surtout dû à une thrombopénie, mais peut-être dû à un trouble de la coagulation (Poplack et al., 1999). La thrombopénie est responsable de purpura, d'ecchymoses, de saignements muqueux, d'épistaxis ou de gingivorragies. Le tableau hémorragique est présent chez environ 50% des patients porteurs d'une LAL. Il peut être fatale lorsqu'il concerne le tractus digestif, le poumon, l'appareil génito-urinaire ou le système nerveux central (Imbert, 2002).
- **Signes tumoraux** sont fréquents dans les LAL et certaines formes de LAM (Hamouda, 2020) :
 - ✓ Adénopathies : sont souvent diffuses, indolentes, de tailles moyennes, symétriques et mobiles.
 - ✓ Splénomégalie : très fréquente chez l'enfant.

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

- ✓ Douleurs osseuses : sont fréquente chez l'enfant, et aussi les formes hyperleucocytaires (taux de GB supérieur à 100000/mm³, elles sont dues à la forte pression intra médullaire.
- ✓ Méningite dite tumorale, par envahissement, elle peut être observée d'emblée où au cours de l'évolution.

I.5.2- Diagnostic biologique

Il permet d'affirmer le diagnostic de leucémie aigüe et de préciser le type cytologique.

➤ L'hémogramme

L'hémogramme permet très souvent d'évoquer d'emblée le diagnostic de leucémie aigüe, il est demandé en premier lieu devant des signes cliniques faisant suspecter une leucémie aigüe. Il permet l'analyse quantitative des éléments figurés de sang : Globules rouges, globules blancs et plaquettes (en mm³) ; l'hémoglobine (en g/100ml) ; VGM (en fl) ; CCMH (en g/100ml) ; TCMH (en pg) ; le taux de réticulocytes et éventuellement le nombre de blastes circulants (**Michele, 2002**).

Il met en évidence deux ordres de signes : une insuffisance sanguine qui est le reflet de l'insuffisance médullaire et la présence de cellules blastiques, signe de la prolifération maligne (**Hamouda, 2020**).

➤ L'examen du frottis sanguin

Le frottis sanguin montre habituellement des blastes en nombre variable d'autant plus nombreux que l'hyperleucocytose est importante, comme ils peuvent être absents au niveau du sang périphérique (**Hamouda, 2020**).

➤ Le myélogramme

La ponction médullaire permet l'étude morphologique des cellules médullaires sur étalement après une coloration classique de type MayGrünwald-Giemsa (MGG)(**Letestu et al., 2003**). Le myélogramme est l'examen clé du diagnostic : il permet la réalisation d'une étude cytologique, immunophénotypique, cytogénétique, et biologie moléculaire (**El Hantatia et al., 2009**). Il permet également de montrer l'envahissement de la moelle par les cellules blastiques avec un % allant de 20 à 100% (**Hamouda, 2020**).

➤ Les études cytologiques et cytochimiques

Ces études permettent de préciser le type de leucémie aigüe : Lymphoblastique (LAL) et myéloblastique(**Hamouda, 2020**).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

L'étude cytologique au MGG détecte d'une part les lymphoblastes, qui sont des cellules jeunes à noyau nucléolé et a cytoplasme non granulaire, et d'autres part les myéloblastes, qui sont des cellules jeunes beaucoup plus grandes à cytoplasme granulaire (**Hamouda, 2020**).

L'étude cytochimique complète l'interprétation cytologique, elle a, donc, pour but de confirmer la lignée d'appartenance des blastes. L'étude cytochimique est généralement réalisée sur des frottis sanguins ou médullaires. Le principe repose sur la dégradation d'un substrat synthétique par l'enzyme étudiée en un produit insoluble et coloré observable en microscope optique. Les colorations de routine concernent essentiellement deux types d'activités enzymatiques : Les myéloperoxydases (MPO) (caractéristiques des LAM) et les estérases (qui sont positives sur les cellules granuleuses et monocytaires) (**Itakura et al., 2009**).

➤ Etude cytogénétique

L'intérêt de cet examen est beaucoup plus pronostic (**Hamouda, 2020**), parmi les anomalies les plus fréquentes et connues, sont : translocation (T) dite t (9, 22) dans les LAL1 et LAL2, et T (8, 14) dans la LAL3.

➤ L'immunophénotypage

La cytométrie en flux est la technique de choix pour la réalisation de l'immunophénotypage des leucémies aiguës. Le but est de repérer les cellules anormales, de déterminer leur lignée d'origine, d'analyser leur degré d'hétérogénéité et d'en déterminer les caractéristiques phénotypiques. Les cellules à analyser étant déjà en suspension, sont faciles à recueillir à partir du sang ou de la moelle osseuse. L'immunophénotypage permet de déterminer, à l'aide d'anticorps monoclonaux, le type de lignée : Lignée B ou lignée T en cas de LAL, ainsi que le stade de maturation. Il permet également de chercher l'existence ou non de marqueurs myéloïdes associés (le CD13, le CD33 et parfois le CD34 qui un marqueur de progéniteurs) (**El-Hantatia, 2009**).

➤ Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire a également un rôle important dans la détection de certaines mutations et grâce au suivi de la maladie résiduelle évaluée sur l'étude du réarrangement des gènes des immunoglobulines pour les LAL B et du TCR pour les LAL T en cas d'absence d'autres mutations.

Les gènes codant les facteurs de transcription régulant le développement lymphoïde sont les plus fréquemment mutés, en particulier dans les LAL B comme par exemple PAX5,

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

IKZF1 et EBF (Patel et *al.*, 2012). Des anomalies additionnelles touchent souvent les gènes suppresseurs de tumeur et ceux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, des récepteurs de cytokines, la voie des tyrosine kinase, la voie RAS ou les gènes impliqués dans les modifications épigénétiques.

Les LAL T sont caractérisées par des mutations activatrices de Notch1 et le réarrangement des facteurs de transcriptions HOX11, TAL1, et MLL. Des mutations touchant des kinases observées dans les LAL B ont également été identifiées dans les LAL T (AB1, PTK2B, JAK2). Les altérations des régions non codantes sont également importantes dans les LAL T (Burnett, 2005).

I.6-Traitement

Le traitement pour la LAL est classé au sens large comme la phase d'induction, le traitement de consolidation, le traitement d'entretien, la prophylaxie du système nerveux central, et la greffe de cellules souches allogéniques.

I.6.1. Radiothérapie

La radiothérapie n'est pas utilisée en première intention, elle est utilisée principalement pour traiter les rechutes neuroméningées ou testiculaires, pour prévenir ou traiter la propagation de la LAL au système nerveux central, en préparation à une greffe de cellules souches, pour soulager la douleur là où la leucémie s'est propagée aux os (si la chimiothérapie n'a pas été efficace) et aussi pour réduire la taille de la tumeur si elle exerce une pression sur la trachée ou d'autres organes vitaux (Bouhnoun, 2012)

I.6.2. Greffe de cellules souches

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) peut être indiquée dans le traitement d'une leucémie aigüe, en première intention ou après une ou plusieurs rechutes. Elle a alors le rôle de consolidation dans le schéma thérapeutique. Elle consiste à remplacer les cellules de la moelle qui sont cancéreuses par des cellules saines qui vont alors coloniser la moelle du patient et produire les différentes cellules différenciées du sang nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Le greffon peut être ponctionné dans les os (cellules souches médullaires) ou dans le sang par cytophèrese (cellules souches périphériques).

I.6.3. Chimiothérapie

Le traitement est habituellement divisé en 3 phases, l'induction, la consolidation et l'entretien. En général, la durée totale du traitement est de 2 à 3 ans. Les piliers de la thérapie d'induction

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

sont la vincristine, anthracyclines, corticostéroïdes et L-asparaginase (**Kantarjian et al., 2004**). L'objectif de cette phase est d'obtenir une rémission complète en détruisant toutes les cellules leucémiques présentes dans le sang, la moelle osseuse et le liquide céphalorachidien (**Kamps et al., 2000**). La phase post-rémission (consolidation ou intensification) implique généralement une série complexe de traitements cytotoxiques, y compris la cytarabine, le méthotrexate à haute dose par voie intraveineuse et le cyclophosphamide (**Brown et al., 2012**), dans cette phase, l'introduction de nouvelles molécules va permettre d'éviter la sélection de clones résistants aux chimiothérapies utilisées dans la phase d'induction.

Les chimiothérapies traditionnelles agissent préférentiellement sur les cellules cancéreuses, en fonction de leur nature à se diviser rapidement (**Gerber, 2008**). Cependant, la chimiothérapie affecte également les tissus normaux/sains ayant la capacité de se diviser rapidement, par exemple la moelle osseuse, la bouche et l'épithélium gastro-intestinal. En conséquence, le traitement intensif provoque des effets toxiques graves chez la plupart des patients, dont la survenue d'infections, alopécie, ulcération buccale, gastrite et diarrhée, d'une cardiotoxicité et d'une myélo-suppression (**Faderl et Kantarjian, 2011**).

De nombreux scientifiques ont vu le moyen d'obtenir des médicaments anticancéreux susceptibles d'être utilisés en chimiothérapie. Par l'étude structurée de pharmacopées parfois empiriques et traditionnelles, ou par le criblage aléatoire (screening) d'abondantes espèces animales et surtout végétales. Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps dans la chimiothérapie pour soigner de nombreuses maladies et différentes formes de cancer.

La Pervenche de Madagascar (*Catharanthus rosea*) est l'une des plantes médicinales contenant des molécules alcaloïdes (vincristine et vinblastine) utilisées en chimiothérapie (**Dumontet, 2011**). La vincristine et la vinblastine inhibent la polymérisation de la tubuline et empêchent la formation des microtubules lors de la métaphase (**Chatelut, 2012**).

II-La Pervenche de Madagascar

II. 1- Définition

La pervenche de Madagascar est l'une des candidates les plus aptes à apparaître être la feuille d'une herbacée poussant en abondance à Madagascar appelé la Pervenche pantropicale assez largement répandue et utilisée comme plante coupe-faim par les navigateurs indigènes de l'Océan Indien. Cette plante est caractérisée par la présence de deux alcaloïdes doubles antimitotiques, vinblastine et vincristine, parfois appelés à tort « dimères ». Ces

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

alcaloïdesappartiennent à la classe des poisons du fuseau mitotique, parce qu'ils empêchent la formation du fuseau permettant la migration des chromosomes(**Johnson et al.,1977**).

II.2- Description botanique

La Pervenche de Madagascar est une plante endémique à l'île de Madagascar où elle pousse jusqu'à une altitude de 1600-1800 m(**Van Der Heijden, et al., 2004**).Son nom scientifique est *Catharantus roseus* (L.) G. Don. *Catharanthus* signifie "fleur propre ou pur" en grec ; *roseus* la couleur "rose" en latin, (L) est l'abréviation pour Linné (Carl von Linné) celui qui a d'abord publié la description de la plante et G. Don pour Georges Don qui l'a classé dans le genre *Catharantus* en 1837, le genre *Catharanthus* comporte 8 espèces dont 7 sont endémiques à Madagascar. Son deuxième nom scientifique est *Vincarosea*. A Madagascar, elle est connue sous diverses appellations selon les régions : vonenina, befala, tonga, felatananamba, heladolo, rivotambelona, salotra, befala, tongatse, felabaratra, tonga, tsimatirinina, tsingevika(**Naghmeh et al., 2015**).

La Pervenche de Madagascar est une plante vivace qui fleurit constamment pour peu qu'elle pousse dans un endroit ensoleillé (**Figure 04**). La partie aérienne de cette plante consiste en un buisson de 20 à 60 cm généralement mais pouvant aller jusqu'à 90 cm de haut. Les tiges sont semi ligneuses rougeâtres et contiennent un latex (**Figure 04a**).Les feuilles sont persistantes, simples, spiralées et opposées, elles sont ovales à lancéolées de 5 à 7 cm de long, à marge ondulée et avec un pétiole court, elles sont glabres des deux côtés et leur face supérieure est brillante, vert moyen à sombre. Les fleurs de 3 à 4 cm sont roses ou blanches ou blanches avec un œil rose au centre. Elles sont présentes toute l'année si le climat est approprié. Elles sont axillaires, tubulaires à corolle à 5 pétales spatulés.Les fruits sont deux follicules cylindriques déhiscents (**Figure 04b**) contenant chacun 12 à 20 graines brunâtres et arrondies (**Figure 04c**) (**Stearn, 1975**).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES



Figure 04 : La Pervenche de Madagascar (Stearn, 1975)

La Pervenche de Madagascar est classée selon APG III(AngiospermPhylogenyGroup III)(2009):

- ✓ Règne: Plantae,
- ✓ Division: Magnoliophyta,
- ✓ Classe: Magnoliopsida: dicotylédones,
- ✓ Ordre: Gentianales,
- ✓ Famille: Apocynaceae,
- ✓ Sous-famille: Rauvolfioideae,
- ✓ Genre: Catharanthus G. Don.

La Pervenche de Madagascar est une plante tolérante contre les stress abiotiques tels que la sécheresse, la chaleur et la salinité. La Pervenche de Madagascar peut survivre dans divers habitats tels que les sols sableux, les prairies, les rivières, les dunes, les terrains vagues, les bords de routes, les roches calcaires et même les plages, cela s'explique par sa résistance aux conditions de vie difficiles (Naghme et al., 2015).

II.3- Compositions chimiques de la pervenche de Madagascar

La Pervenche de Madagascar possède plusieurs activités biologiques, c'est l'une des plantes médicinales les plus étudiées à ce jour. La Pervenche de Madagascar appartient à la classe des alcaloïdes indoliques terpéniques, elle est constituée d'alcaloïdes mono-indoliques (Catharanthine, Vindoline), ces alcaloïdes sont constitués d'une partie indolique et d'une partie monoterpénique dont la teneur est d'environ 0,1 % dans les feuilles de la plante. Ils ont une

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

faible activité antimitotique. Les alcaloïdes bis-indoliques (Vinblastine, Vincristine) sont également trouvés dans les feuilles de la plante. Ces alcaloïdes sont constitués par le couplage de plusieurs molécules.

La plante possède également différents groupes chimiques qui possèdent une activité antitumorale (Kosmideret al., 2004) tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les anthocyanes (Aslam et al., 2010 ; Leroux, 2011). Plusieurs éléments chimiques importants sont également retrouvés dans la plante. Par exemple, dans les feuilles il y a une forte concentration en Na, Ca, Mg, Cr, Fe, Al, Cu alors que dans les fleurs de la pervenche, il y a une forte concentration en K et en Zn (Aziz et al., 2016).

II.4- Principaux alcaloïdes de la pervenche de Madagascar

Les alcaloïdes sont des substances naturelles organiques basiques et hétérocycliques contenant dans leurs structures chimiques complexes un atome d'azote (Figure 05) (Wink et al., 2005). Ces composés sont très majoritairement d'origine végétale et peuvent manifester des activités biologiques et/ou pharmacologiques diverses (Aniszewski, 2007).

Les alcaloïdes de Vinca sont des substances produites dans les feuilles de la pervenche de Madagascar qui est classée dans la famille des Apocynacées. Le nom de Vinca provient de son ancien nom : Vincarosea, mais l'étude de ses caractéristiques morphologiques en 1966 ont abouti à sa reclassification alors incorrecte et à un nouveau nom : Catharanthus roseus. Cependant, le nom commun de Vinca est resté pour dénommer cette famille d'alcaloïdes (Miyazaki et al., 2007).

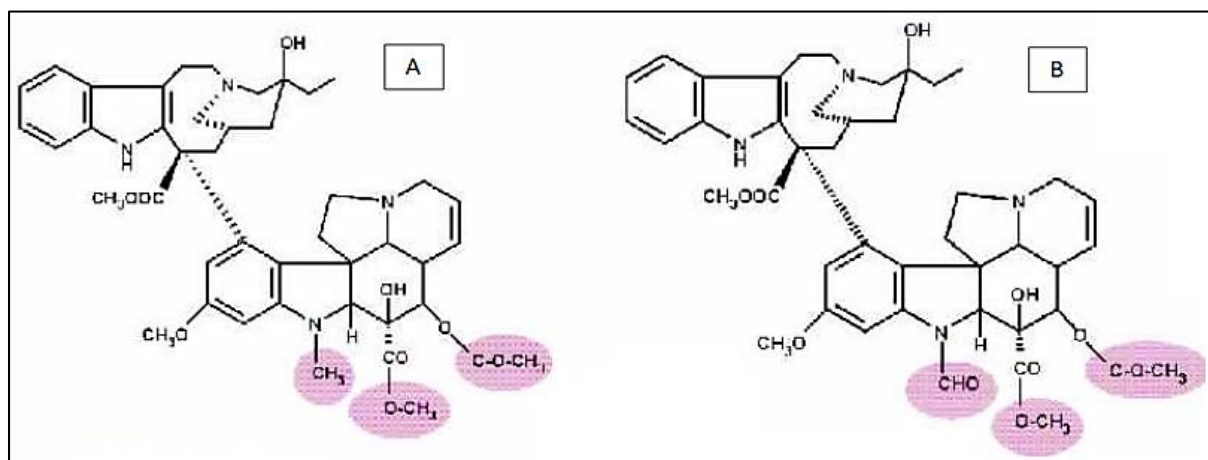


Figure 05 : Structure chimiques des principaux alcaloïdes de la pervenche de Madagascar.

A : la vinblastine, B : la vincristine (Miyazaki et al., 2007)

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

II.5- Propriétés thérapeutiques de la Pervenche de Madagascar

La Pervenche de Madagascar a été utilisée traditionnellement pour traiter de nombreuses maladies selon l'endroit de culture (**Van Der Heijden et al., 2004**). Ainsi, elle était utilisée traditionnellement comme remède contre l'hypertension, l'oligurie et les troubles menstruels. Elle a été utilisée pour traiter les piqûres de guêpes (par décoction ou infusion de feuilles). A Hawaï, elle était utilisée comme hémostatique (la plante est bouillie puis appliquée en cataplasme), pour arrêter les saignements. En Chine elle trouvait sa place comme diurétique et comme remède contre la toux (en tisanes). En Europe, elle prêtait ses propriétés magiques, d'où son surnom de « violette des sorciers » et les Jamaïcains l'utilisaient comme remède contre le diabète (en tisanes) (**Johnson et al., 1977**).

Les extraits de Pervenche de Madagascar ont été étudiés en vue d'une possible activité anticancéreuse, menant à la découverte majeure des alcaloïdes de la pervenche que sont la vinblastine et la vincristine, ces deux molécules sont deux antimétabolites puissants utilisés seuls ou en association avec d'autres agents anticancéreux dans le cadre des traitements de la maladie de Hodgkin, des lymphomes, sarcomes et carcinomes mammaires (**Johnson et al., 1977**). Ces molécules sont d'ailleurs devenues un dénominateur commun de nombreux protocoles de chimiothérapie en servant notamment d'agents « synchronisateurs », permettant de renforcer l'activité des autres molécules anticancéreuses associées (**Svoboda, 1977**).

D'autres molécules retrouvées dans les extraits de Pervenche ont trouvé des applications en thérapeutique. C'est le cas de la réserpine pour ses propriétés sédatives et hypotensives, et de la vincamine et de l'ajmalicine ou raubasine qui entrent dans la composition de médicaments destinés à améliorer la fonction cérébrale du sujet âgé notamment dans le cadre des troubles psychiques de la sénescence ou des suites d'accidents vasculaires-cérébraux. Les troubles sensoriels tels que les rétinopathies d'origine vasculaire ou les troubles de l'oreille interne (vertiges et acouphènes) en sont également de bonnes indications (**Shanks et al., 1998**).

Des études plus récentes sur *C. roseus* ont révélé la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des phénols, des carbohydrates, des saponines, des quinones, des tannins et des glycosides cardiaques dans ses divers extraits (**Rani et al., 2017**). De plus, une forte activité anti-radicalaire des nouvelles combinaisons phénoliques dans la graine, la tige, la feuille et le pétale, et aux acides organiques dans la racine de *C. roseus* (**Pereira et al., 2010**) a été également révélée. La cause connue des pathologies tels que le cancer, les maladies

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

cardiovasculaires, l'athérosclérose, l'hypertension, de l'ischémie (blessure de perfusion), le diabète sucré, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson), l'arthrite rhumatoïde et du vieillissement étant le stress oxydant (Valko et al., 2007), l'utilisation de produits riches en phénols et flavonoïdes qui se sont révélés pour leurs capacités antioxydantes pourrait jouer un rôle important dans la prévention de ces pathologies (Favier, 2003).

L'inflammation est un symptôme très fréquent de nombreuses maladies chroniques. C'est une réponse protectrice normale à une lésion tissulaire causée par agent microbien, un traumatisme physique ou un agent chimique. Les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les cas d'inflammation tel que *Catharanthus roseus* semblent être une alternative fiable et logique à la recherche d'agents anti-inflammatoire sûr et efficace. Il est bien connu que la dénaturation des protéines conduit à des maladies inflammatoires et des arthritiques. Les produits naturels qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seront donc utiles pour le développement de la thérapie anti-inflammatoire (Alhakmani et al., 2013).

Des rapports suggèrent que les extraits de racines et de feuilles de *C. roseus* possèdent de activités antibactériennes puissantes contre de nombreuses bactéries (Belkhiri, 2009).

II.6- Mécanisme d'action de la pervenche de Madagascar

L'activité anticancéreuse de la vinblastine et la vincristine est reliée au blocage de la division cellulaire. C'est-à-dire, qu'au début de la mitose, les deux dimères se fixent d'une manière spécifique sur la tubuline en inhibent la formation des microtubules qui forment le fuseau achromatique, par la suite le cycle cellulaire s'arrête au niveau de la métaphase. De ce fait, ces alcaloïdes sont désignés sous le terme de poisons du fuseau achromatique ou inhibiteurs de la polymérisation des microtubules (Lobert et al., 1996) ont mis en évidence le mécanisme de l'interaction des alcaloïdes vinca (la vinblastine, et la vincristine) avec la tubuline et l'inhibition de l'assemblage des microtubules.

En absence de fuseau, les chromosomes se dispersent au hasard à travers le cytoplasme, ce qui aboutit à la mort des cellules. En outre, la vincristine peut également agir sur d'autres systèmes cellulaires, tels que la synthèse d'ARN et d'ADN, l'AMP cyclique, la biosynthèse des lipides et l'ATP ase de transport de Ca^{2+} calmoduline-dépendante. Les vinca-alcaloïdes peuvent exercer leur effet sur le processus antimitotique, en se liant à un site spécifique de la

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

tubuline et en formant un complexe d'agrégation tubuline-alcaloïde ;en se liant a un site de haute affinité de la tubuline incorporé dans les microtubule ,et en inhibant l'incorporation de tubuline supplémentaire dans le microtubule existant ;en se liant à un site de faible affinité sur la paroi de microtubule, ce qui entraine la séparation du protofilament(**Figure 06**) (**Zakariya et al., 2017**).

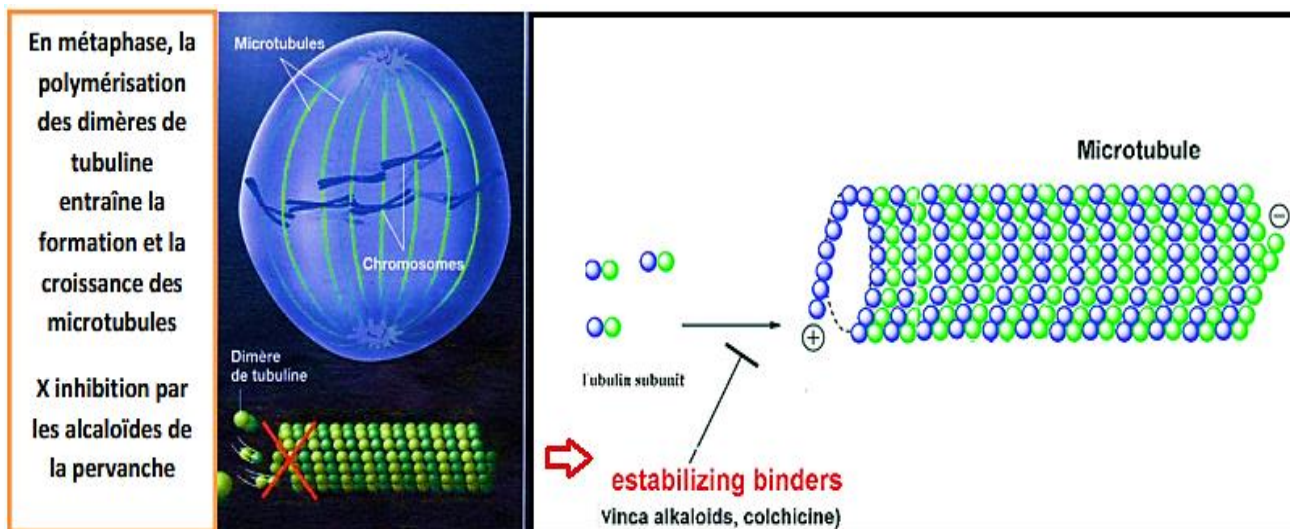


Figure 06 : Mécanisme d'action des Vinca-alcaloïdes (**Zakariya et al., 2017**) (**Modifiée**)

II.6.1- L'effet de vincristine et vinblastine sur les leucémies

La vinblastine peut induire une apoptose très rapide dans les cellules de leucémie lymphoïde chronique primaires malgré le fait qu'elles ne soient pas prolifératives (**Bates et al., 2011**; **Salerni et al., 2010**). De plus, cette apoptose rapide dans des lignées cellulaires avec d'autres types de leucémies en combinant la vinblastine avec diverses approches ciblant les protéines anti-apoptotiques MCL1 ou BCL2 (**Albershardt et al., 2011**). Les effets des alcaloïdes de la vinca semblent toujours être initiés par la perturbation des microtubules.

La vincristine est un médicament de chimiothérapie antimitotique, il est utilisé dans le traitement de plusieurs tumeurs solides et hémopathies malignes, notamment le cancer du sein, les lymphomes non hodgkiniens (LNH) et la leucémie (**Gidding et al., 1999**). La vincristine exerce son effet antinéoplasique en inhibant la polymérisation de la tubuline et son incorporation dans les microtubules, ce qui empêche l'assemblage du fuseau mitotique, conduisant à l'extension de la mitose et donc à l'apoptose (**Gascoigne et Taylor, 2008**). La survie globale des patients adultes atteints d'un cancer hématologique s'est améliorée au cours des dernières décennies grâce aux nouvelles options de traitement, et plus de 80 % des enfants atteints de LAL sont désormais des survivants à long terme(**LindhardMadsen et al., 2019**). Son effet anti-leucémique in vivo est

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

déterminé à la fois par la variabilité de l'exposition des cellules leucémiques et la variabilité de la sensibilité des cellules à l'effet de la vincristine. La sensibilité des cellules leucémiques in vitro a été bien étudiée (**Kaspers et al., 1995**), mais la variabilité de l'exposition des cellules leucémiques in vivo a montré moins d'attention(**Groninger et al., 2002**).

II.7- Mode d'administration de la vincristine et la vinblastine

II.7.1- La vincristine

La vincristine est utilisée par voie intraveineuse stricte, de préférence dans la tubulure d'une perfusion de soluté salé ou glucosé isotonique, sans dépasser une dose totale de 2mg par injection. Elle est utilisée toutes les semaines en monothérapie ou tous les mois en polychimiothérapie. Elle ne doit jamais être utilisée comme traitement de première intention et, en l'absence de réponse après 3 à 6 semaines, il est inutile de poursuivre le traitement (**Zakariya et al., 2017**).

II.7.2- La vinblastine

Elle est utilisée par voie intravineuse stricte en 1 à 3 minutes, à la dose de 5 à 10 mg/m³/semaine sans dépasser 18 mg/m³ chez l'adulte, de préférence dans la tubulure d'une perfusion de soluté salé isotonique, après dissolution de chaque flacon par 10 ml de soluté salé isotonique. (**Zakariya et al., 2017**).

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective, effectuée au niveau de l'Institut Ishak Ibn Honain de Boufarik sur une période allant du 07 Mars 2021 au 30 Juin 2021.

Notre étude est basée l'extraction de la teinture mère de la pervenche par broyage, suivi par le criblage phytochimique et caractérisation des activités biologiques de la pervenche.

Malheureusement, suite à la propagation de la pandémie au SARS-Cov2 au cours de notre période de stage pratique au niveau du centre de recherche CRAPC et le confinement qui s'en est suivi, nous n'avons pas pu identifier les principes actifs d'une part, et les appliqués sur les cas leucémiques au niveau de l'Institut Ishak Ibn Honain de Boufarik- Blida.

II.1- Matériel

II.1.1- Matériel biologique

➤ Echantillonnage

Les feuilles de pervenche ont été fournies par l'Institut Ishak Ibn Honain de Boufarik (**Annexe 1**).

II.1.2- Matériel non biologique

Une gamme de matériel non biologique est utilisée pour mener à bien les techniques réalisées à l'Institut Ishak Ibn Honain de Boufarik (verreries, colorants, réactifs, appareillages et autres). Les détails de l'appareillage et les réactifs sont présentés dans l'**Annexe 02**.

II.2. Méthodes

II.2.1- Méthode d'extraction de l'extrait brute de la pervenche (**Annexe 3**)

- ✓ Broyage des feuilles de pervenche avec un mortier ;
- ✓ Faire diluer l'alcool 96° avec de l'eau distillée ;
- ✓ Filtrer la poudre en ajoutant de l'alcool dilué dans un verre à pied pour obtenir une teinture mère de pervenche.
- ✓ Laisser vaporiser pendant 2 jrs dans un cristalliseur.

II.2.2- Criblage phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de réactions physico-chimiques permettant de déterminer les principaux groupes chimiques contenus dans la pervenche (**Bashige, 2020 ; Hamadou, 2018 ; Haddouchi, 2016**).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

➤ Recherche des alcaloïdes

• Préparation du macérât

A 1g de poudre de pervenche, ajouter 5mL d'acide sulfurique dilué au 1/10e. L'ensemble est laissé en macération à la température du laboratoire pendant 24 heures puis filtré. Le filtrat obtenu est complété à 5ml avec de l'eau distillée.

• Caractérisation

Dans trois tubes à essai, introduire dans chacun 1mL de filtrat, y ajouter 0,5mL de réactif de Dragendorff, de réactif de Bouchardat et de réactif de Mayer. La présence d'alcaloïdes est caractérisée par la formation :

- D'un précipité rouge orangé avec le réactif de Dragendorff.
- D'un précipité brun avec le réactif de Bouchardat.
- D'un précipité blanc jaunâtre avec le réactif de Mayer.

➤ Recherche des composés phénoliques

• Préparation de l'infusé

Introduire 5gr de poudre de pervenche dans 100mL d'eau bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250mL. Arrêter l'ébullition et refermer l'erlenmeyer avec un verre de montre ou le surmonter d'un entonnoir et laisser infuser pendant 15min. Ensuite filtrer et rincer avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100mL de filtrat.

• Caractérisation des anthocyanes

A 5mL d'infusé présentant une coloration plus ou moins foncée, ajouter 5mL d'H₂SO₄ à 10% puis 5mL d'NH₄OH. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violet en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyanes.

• Caractérisation des tanins

Introduire dans un tube à essai 5mL d'infusé et ajouter 1mL de solution aqueuse diluée de FeCl₃ à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

✓ Recherche des tanins catéchiqes (réaction de Bate-Smith)

A 5mL d'infusé, ajouter 1mL d'HCl puis porter à ébullition pendant 10min. L'observation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool amylique ou isoamylique indique une réaction positive.

✓ Recherche des tanins galliques (réaction de Stiasny)

La différenciation des tanins catéchiqes et galliques est obtenue par la réaction de Stiasny.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A 15mL d'infusé, ajouter 7,5mL de réactif de Stiasny puis chauffer au bain-marie à 90°C pendant 15 à 30min. L'apparition d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer le filtrat avec l'acétate de sodium pulvérisé puis ajouter quelques gouttes (1mL) de la solution de FeCl₃1%. Le développement d'une teinte bleue noirâtre indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

➤ **Caractérisation des flavonoïdes**

• **Réaction à la soude**

1gr de poudre de pervenche sont mis à macérer, pendant 24H, dans 15mL d'HCl 1%. Après filtration, 5mL du filtrat sont alcalinisés par la soude ou l'ammoniaque. L'apparition d'une coloration jaune indique la présence de flavonoïdes.

• **Réaction à la cyanidine (Test de Shinoda)**

A 5mL d'infusé, ajouter 5mL d'alcool chlorhydrique puis quelques copeaux de magnésium et 1mL d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose-orangée (flavones) ou rose-violacée (flavanones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aures, les catéchines et les isoflavones.

II.2.3- Dosage des composés phénoliques

➤ **Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage est effectué suivant les recommandations de **Cheoket *al.* (2013)**.

• **Principe**

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

- **Mode opératoire**

Un volume de 200 μ L de la solution mère d'acide gallique et de l'extrait méthanolique de l'espèce étudiée est introduit dans un tube à essai, 1mL du réactif de FolinCiocalteu dilué 10 fois y est additionné. Après un repos de 5min, on introduit 800 μ L de carbonate de sodium à 7,5%. Le tube est agité et conservé durant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1202. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme étalant. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/gr de matière sèche).

- **Dosage des tanins totaux**

La teneur en tanins totaux a été évaluée selon la méthode colorimétrique décrite par Polshettiwar et *al.* (2007).

- **Principe**

Le dosage est basé sur la réduction, en milieu alcalin, des acides phosphomolybdique et tungstique contenus dans le réactif de Folin-Denis (RFD). La réaction donne une coloration bleue dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 755nm.

- **Mode opératoire**

0,5mL de RFD et 1mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3 0,5%) ont été introduits dans des fioles jaugées. 100 μ L de la dilution des extraits méthanoliques y ont été ajoutés, le volume de la solution a été ajusté à 5mL par l'eau distillée. Après une incubation de 30 min, l'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1202. La teneur en tanins totaux a été déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une série de dilutions de l'acide tannique (SM 10mg/mL). Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent acide tannique par gramme de matière végétale sèche (mg EAT/gr MS).

- **Dosage des flavonoïdes**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishenetal. (1999).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

- **Principe**

Le dosage est basé sur la formation de complexes entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits, de couleur jaune, absorbent dans le visible à 510nm.

- **Mode opératoire**

500µL des extraits bruts sont mélangés avec 2mL d'eau distillée, et additionnés de 150µL de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5%. Après 5min d'incubation, 100µL de trichlorure d'aluminium à 10% est rajouté au mélange. Après une nouvelle incubation de 6min, Ajouter 1mL de carbonate de sodium 1M. Le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu et l'absorbance de la solution est déterminée à 510nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme contrôle positif. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS)

II.2.4- Evaluation des activités biologiques

- **Activité antioxydante**

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de piégeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), selon les recommandations de **Boulila et al. (2015)**.

- **Principe**

La méthode au diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH) est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable (DPPH•) en présence d'un antioxydant, donneur d'hydrogène (AH), ce qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H. La réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, initialement violet foncé sous sa forme libre, devient jaune pâle après transfert d'électron par des composés antioxydants. Cette réduction qui se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH• est suivie par spectrophotométrie à 515nm par rapport à un standard, l'acide ascorbique.

- **Mode opératoire**

2mL d'une solution méthanolique de DPPH, préparée à 0,04gr/l, sont ajoutés à 1mL de chacune des dilutions de l'extrait méthanolique et de l'acide ascorbique. Après 60min d'incubation à l'abri de la lumière, les absorbances sont lues à 515nm. Les courbes exprimant

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

le pourcentage de piégeage du DPPH en fonction de la concentration, en mg/mL, de l'extrait méthanolique et celle de l'acide ascorbique sont tracées.

➤ **Activité anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par la méthode de dénaturation des protéines, selon les recommandations d'**Alhakmani et al. (2013)**.

• **Mode opératoire**

Le mélange réactionnel est constitué de 2ml d'extrait méthanolique de l'espèce étudiée à différentes concentrations (100-500µg/ml) et 2,8ml d'eau distillée ajustée à pH= 6,4 (tampon PBS), auquel est ajouté 2ml d'albumine d'œuf. Le tout est incubé à 37°C pendant 15 minutes. La même expérience est répétée avec l'acide acétylsalicylique, utilisé comme un témoin positif. La dénaturation est induite en mettant le mélange réactionnel dans un bain-marie chauffé à 72°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 660nm en utilisant l'eau distillée comme blanc.

➤ **Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne a été évaluée en deux étapes :

- La sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits a été recherchée par la méthode de diffusion sur disques.
- La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode des micro-dilutions.

• **Mode opératoire**

✓ **Test de sensibilité**

Des suspensions bactériennes ont été préparées dans une solution physiologique à partir de colonies jeunes (18-24H), en ajustant la turbidité à 0,5 McFarland. À l'aide d'un écouvillon stérile, les bactéries en suspension ont étéensemencées sur une surface gélosée sèche (gélose Mueller-Hinton liquéfiée, coulée et refroidie dans des boîtes de Pétri). Des disques stériles de papier (6 mm de diamètre) ont ensuite été placés puis imprégnés de 10µL d'extrait méthanolique. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24H. La souche est considérée comme résistante pour un diamètre inférieur à 8mm, modérément sensible entre 8 et 14mm, sensible pour un diamètre d'inhibition entre 14 et 20mm et très sensible si le diamètre est supérieur à 20mm.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits méthanoliques**

Des suspensions bactériennes des cellules bactériennes jeunes ont été préparées dans des tubes stériles, contenant de l'eau physiologique à une valeur de 0,5 McFarland. Ces derniers, doivent être utilisés dans les 30min suivantes pour éviter le changement du nombre de cellules bactériennes. Dans les puits des plaques de micro-tubes, on mélange 50µl des différentes dilutions des extraits méthanoliques, préparées dans le DMSO, avec 100µl de Mueller Hinton liquide (MH liquide + rouge de phénol 20mg/ml et du glucose 20g/ml). On ajoute dans chaque puits, 50µl de chaque suspension bactérienne. Pour vérifier que les résultats de sensibilité sont exacts, il faut inclure un témoin positif et un autre négatif pour chaque souche. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24H.

II. 2.5- Analyse qualitative des flavonoïdes

La séparation des flavonoïdes a été réalisée par un système HPLC Shimadzu avec un détecteur UV, une colonne chromatographique C18 (4,6 X 25 mm, 5 µm).

La température de la colonne était maintenue à 45 °C. La phase mobile est composée d'un solvant (A) : un mélange d'eau (80 %), acétonitrile (19 %) et acide formique (1 %), et d'un solvant (B) : un mélange d'acétonitrile (59 %), méthanol (40%) et acide formique (1 %).

L'élution était réalisée selon le programme suivant :

Tableau I : Programme de l'élution

| Temps (min) | Solvant B, % (v/v) |
|-------------|--------------------|
| 0 | 0 |
| 0-5 | 5 |
| 5-15 | 15 |
| 15-20 | 20 |
| 20-40 | 60 |
| 40-45 | 100 |
| 45-50 | 0 |

Le débit était de 1 ml/min, le volume d'injection était de 10 µl et la détection s'est faite à une longueur d'onde de 350 nm. La concentration de la solution injectée était de 5 mg/ml pour l'extrait méthanolique et de 1 mg/10 ml de standard pur dans du méthanol.

CHAPITRE III :

RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS

Notre étude prospective s'est étalée du 07 Mars 2021 jusqu'au 30 Juin 2021. Notre étude, comprenait trois volets :

- Le criblage phytochimique de la pervenche
- L'analyse quantitative des flavonoïdes.
- Le troisième volet concernait les trois activités biologiques de la pervenche (antioxydante, anti-inflammatoire, et antibactérienne).

III.1-Criblage phytochimique de la pervenche

Les principaux groupes chimiques contenus dans la pervenche sont présentés dans le **tableau II**.

Tableau II : Criblage phytochimique de la pervenche

| | Réaction | Pervenche |
|--|---------------------------------|------------------|
| Alcaloïdes | Réactif de Bouchardat | (+++) |
| | Réactif de Dragendorff | (+++) |
| | Réactif de Mayer | (+++) |
| Composés phénoliques | Réactif chlorure ferrique | (+++) |
| Anthocyanes | Acidification et alcalinisation | (+) |
| Flavonoïdes | Réaction à la cyanidine | (-) |
| | Test à la soude | (-) |
| Tanins condensés (Tanins catéchiques) | Réaction de Bate-Smith | (-) |
| Tanins hydrolysables (Tanins galliques) | Réaction de Stiasny | (+++) |

(+++): Réaction fortement positive.

(++): Réaction moyennement positive.

CHAPITRE III : RESULTATS

(+): Réaction faiblement positive.

(-): Réaction négative.

Selon le tableau II, les alcaloïdes, les composés phénoliques, et les tanins sont présents en abondance dans la pervenche. Cette plante possède également les anthocyanes, mais en faible quantité par rapport aux autres groupes chimiques.

Les flavonoïdes n'ont pas été détectés par le criblage phytochimique, mais ils sont détectés par d'autres techniques.

III.2-Teneurs de la pervenche en composés phénoliques des extraits méthanolique et en tanins totaux

Les analyses quantitatives des composés phénoliques des extraits méthanolique et des tanins totaux, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique et l'acide tannique comme standard, respectivement **Figure 07 et 08**). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg EAG/g MS, en mg ETG/gr MS (**Tableau III**).

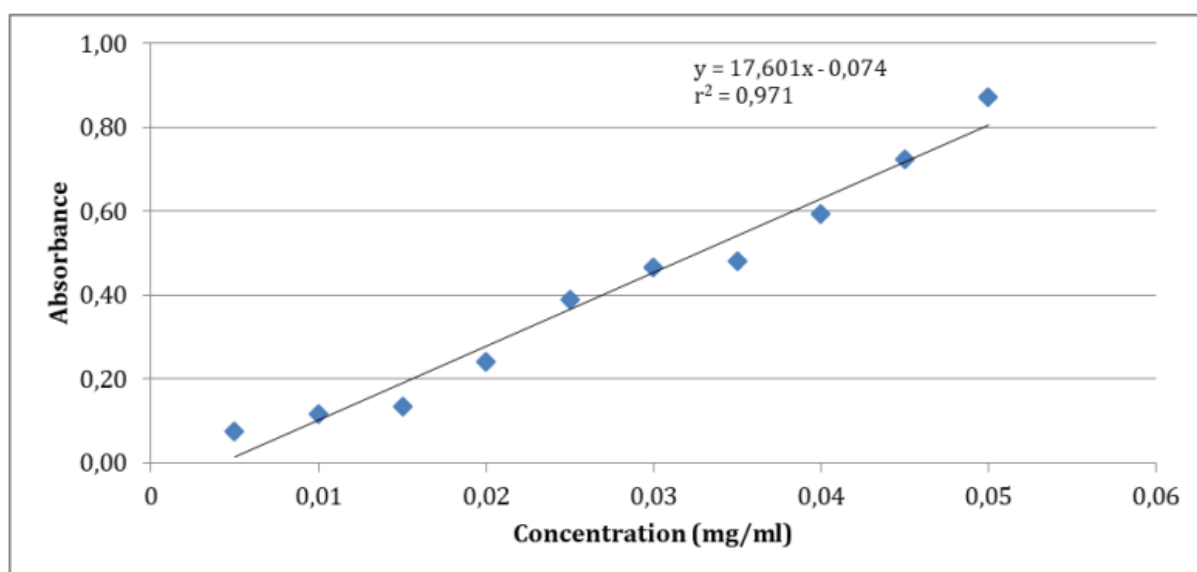


Figure 07 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Nous avons constaté que, plus la concentration de l'acide gallique est élevée, plus l'absorbance est importante. L'absorbance enregistrée sera donc celle de la substance dosé (polyphénols totaux) (**Figure 07**).

CHAPITRE III : RESULTATS

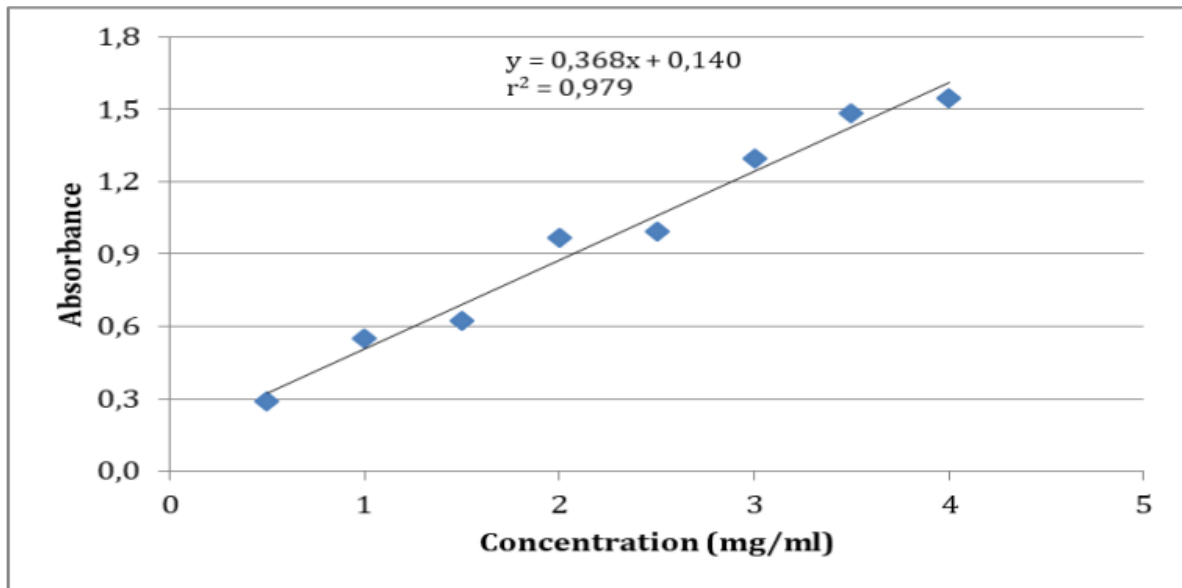


Figure 08 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins totaux

La **figure 08**, représente la courbe d'étalonnage de la concentration de l'acide tannique (mg/ml) en fonction de l'absorbance (nm). Le résultat montre que la concentration de l'acide tannique est élevée en fonction de l'absorbance. L'absorbance enregistrée montre alors la présence des tanins totaux dans la pervenche de Madagascar.

Tableau III : Teneurs de la pervenche en composés phénoliques des extraits méthanolique et en tanins totaux

| Paramètre | Composés phénoliques | Tanins totaux |
|--|----------------------|---------------|
| Teneur en mg EAG/gr MS et en mg EAT/gr MS | 1.404 | 3.653 |

EAG : équivalent d'acide gallique, **EAT** : équivalent d'acide tannique, **MS** : matière sèche

Les teneurs en composés phénoliques représentent 1.404 mg EAG/grMS. Cette concentration a été mesurée dans l'extrait méthanolique, avec un pourcentage de 28%, par rapport aux tanins, où nous enregistrons une teneur de 3.653mg EAG/grMS, avec un pourcentage 72% (**Tableau III**).

CHAPITRE III : RESULTATS

III.3- Teneurs de la pervenche en flavonoïdes des extraits méthanoliques

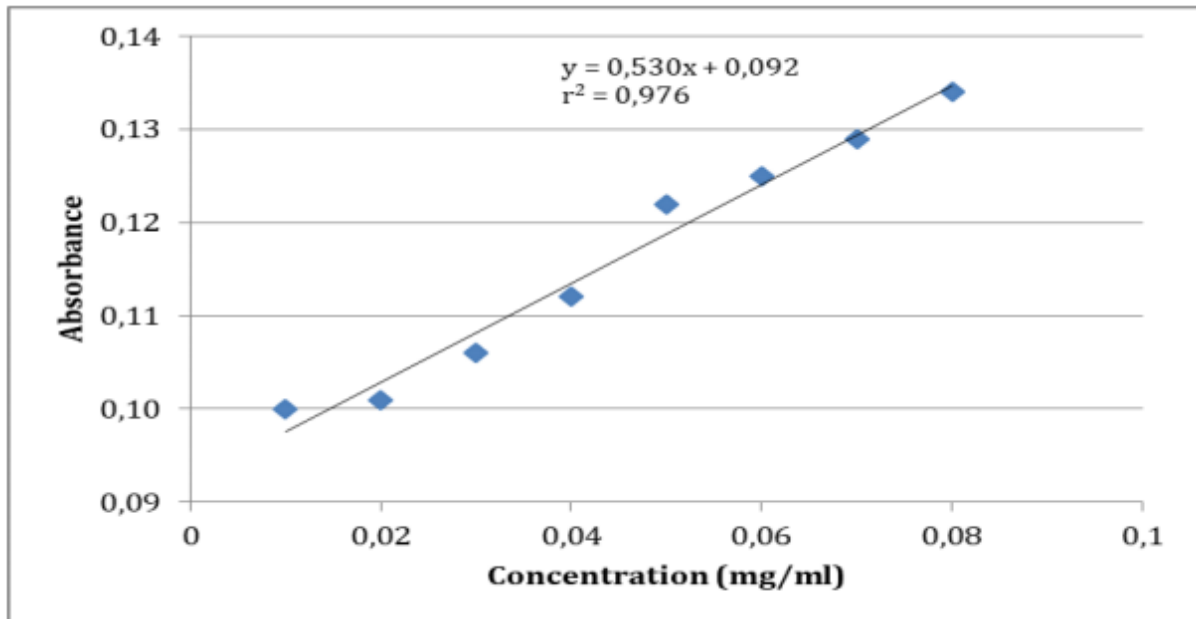


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Nos résultats montrent que la concentration de la quercétine est proportionnelle par rapport à l'absorbance. Ces résultats montrent la présence des flavonoïdes dans la pervenche de Madagascar (**Figure 9**).

Tableau IV : Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques

| Espèce | Pervenche |
|-----------------------|-----------|
| Teneur en mg EQ/gr MS | 5.9 |

Les flavonoïdes ont été détectés dans la pervenche de Madagascar. Les teneurs en flavonoïdes représentent 5.9 mg EQ/grMS (**Tableau IV**)

III.4-Analyse qualitative des flavonoïdes

Le chromatogramme d'HPLC Shimadzu de l'extrait de la pervenche est représenté ci-dessous (**Figure 10, Tableau V**).

CHAPITRE III : RESULTATS

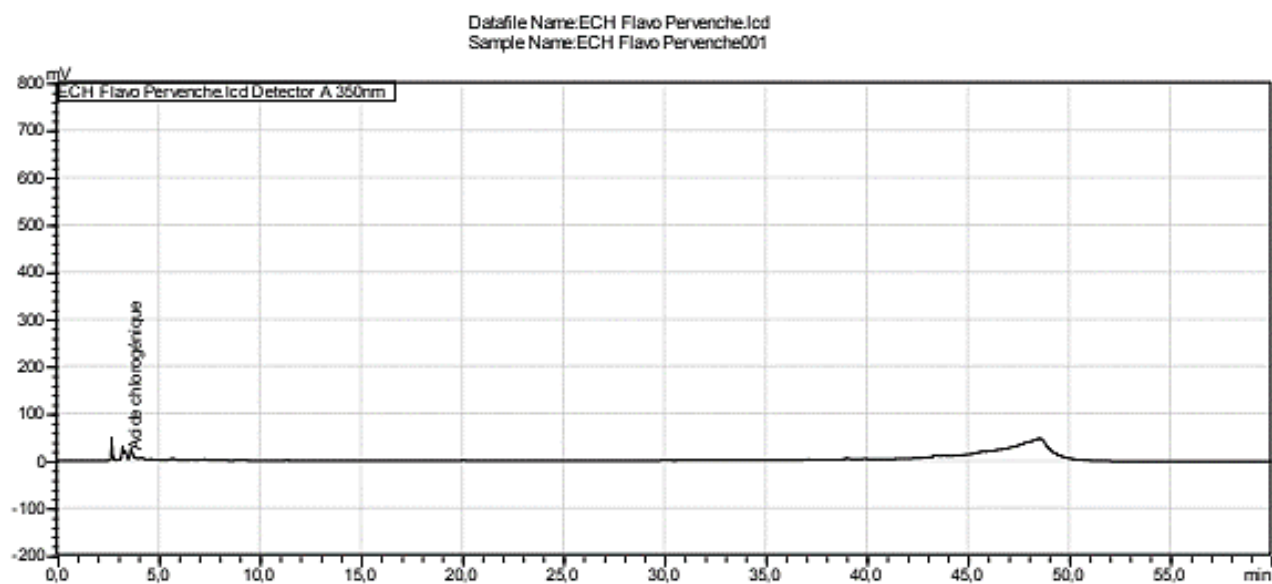


Figure 10 : Chromatogramme d'HPLC de la pervenche enregistrée à 350 nm

A la lumière de ce résultat, nous constatons que l'extrait méthanolique de la pervenche possède des flavonoïdes (**Figure 10**).

Tableau V : Séparation des flavonoïdes de la pervenche

| T_R (min) | T_R standard (min) | Identification |
|-------------|----------------------|---------------------|
| 2,683 | / | Non identifié |
| 3,218 | 3.338 | Acide chlorogénique |
| 3,644 | / | Non identifié |

La comparaison du temps de rétention (**Tableau V**) des standards avec ceux enregistrés dans le chromatogramme (**Figure 10**) a permis l'identification probable d'un type de flavonoïde dans l'extrait. L'analyse quantitative des extraits de la pervenche montre la présence de l'acide chlorogénique.

III.5- L'activité antioxydante de la pervenche

L'activité antioxydante de la pervenche a été évaluée par le test de DPPH. La courbe d'étalonnage antioxydante tracée en utilisant la méthode de piégeage du radical DPPH comme standard en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la pervenche (**Figure 11**), et sont exprimés en mg/ml (**Tableau VI**).

CHAPITRE III : RESULTATS

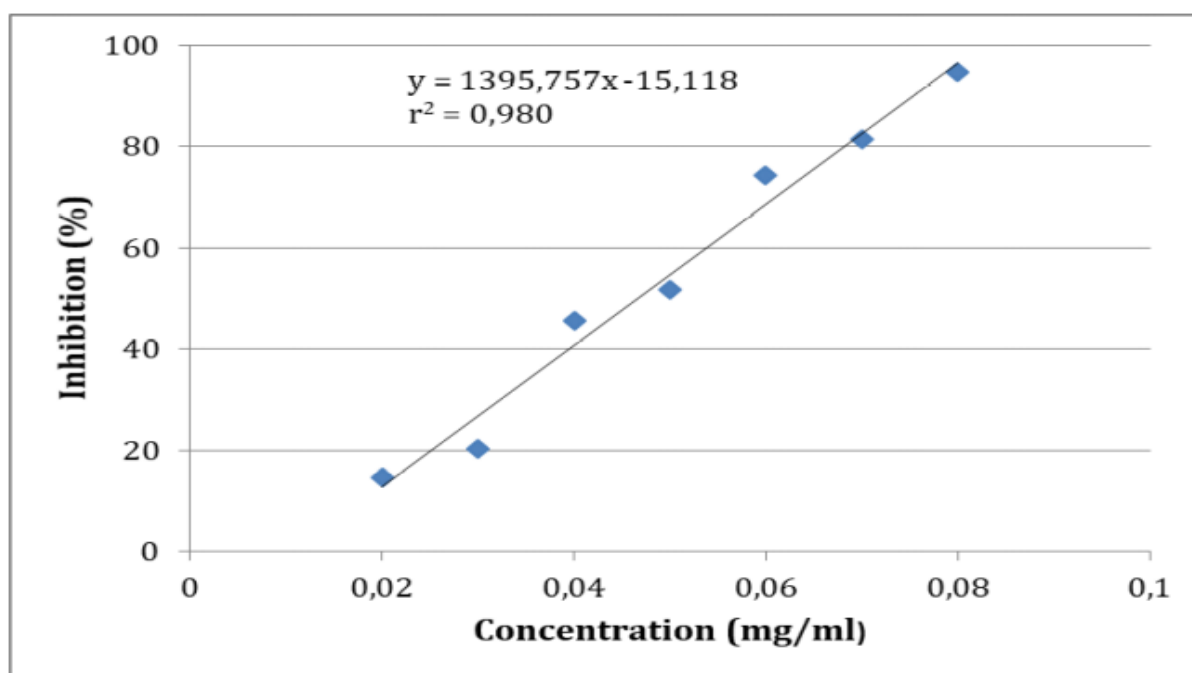


Figure 11 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la pervenche

La courbe d'étalonnage de l'activité radicalaire exprime l'augmentation de l'absorbance du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la pervenche. Ce qui montre la présence de molécules anti oxydante (**Figure 11**).

Tableau VI : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC50)

| Espèce | Acide ascorbique | Pervenche |
|--------------|------------------|-----------|
| IC50 (mg/ml) | 0.040 | 0.047 |

IC : Inhibitrice Concentration

L'extrait méthanolique de la pervenche possède une activité antiradicalaire, qui représente 54.02%, ce résultat est proche de celle du standard (acide ascorbique) qui représente 45.98% (**Tableau VI**).

III.6- L'activité anti-inflammatoire de la pervenche

La pervenche constitue une source potentielle de molécules naturelles bioactives qui empêche la dénaturation des protéines tissulaires. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de cette plante sont représentés dans la **figure 12** et le **tableau VII**.

CHAPITRE III : RESULTATS

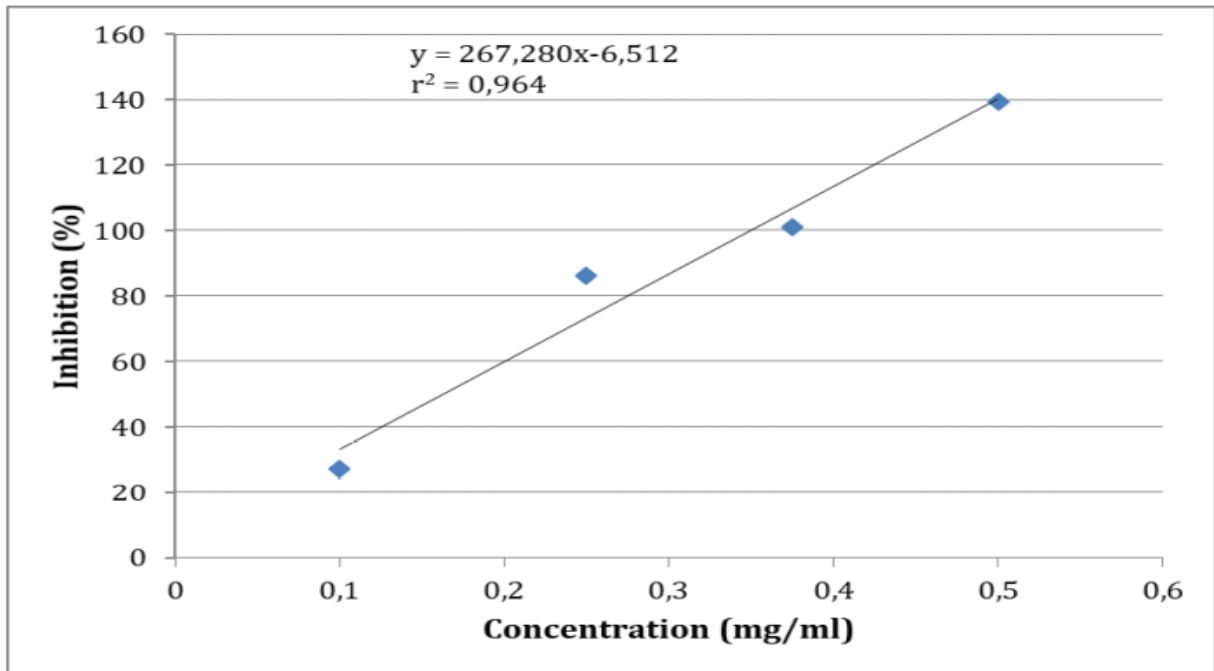


Figure 12 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de la pervenche

Tableau VII : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC50)

| Espèce | Aspirine | Pervenche |
|--------------|----------|-----------|
| IC50 (mg/ml) | 0.302 | 0.163 |

IC : Inhibitrice Concentration

L'extrait méthanolique de la pervenche possède une activité anti-inflammatoire supérieure à celle du standard (acide acétylsalicylique) (**Tableau VII**).

III.8-L'activité anti-bactérienne de la pervenche

L'activité antibactérienne avec les extraits de la pervenche a été réalisée, en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Tableau VIII**).

CHAPITRE III : RESULTATS

Tableau VIII : Sensibilité et CMI (mg/mL) des souches bactériennes testées aux extraits méthanoliques de la pervenche

| Espèce végétale | Pervenche (CMI en mg/ml) |
|--|--------------------------|
| Espèce bactérienne | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> NDM-1 | R |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 3.33 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 4 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | R |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 | R |
| <i>Serratia marcescens</i> | 2.5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 2.5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | S.N.D |

R → résistant.

S.N.D → souche sensible mais la CMI n'a pu être déterminée.

D'après le **tableau VIII**, les résultats de la sensibilité des souches bactériennes testées aux extraits méthanoliques de la pervenche montrent que la pervenche présente une activité antibactérienne plus importante, vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus* avec des CMI de 3.33, 4, 2.5, et 2.5 mg/mL, respectivement. Cette activité importante est due à la richesse de la pervenche en alcaloïdes qui sont les composés majoritaires, vinblastine, vincristine ... etc (**Tableau VIII**).

CHAPITRE IV :
DISCUSSION DES RESULTATS

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

Le criblage d'extraits de plantes joue un rôle très important dans le cadre de la recherche pharmaceutique pour répondre aux besoins de santé publique actuels. De plus, les caractérisations de la pervenche de Madagascar nous permettent de préciser ses composés actifs.

IV.1-Le criblage phytochimique

D'après les résultats du criblage phytochimique obtenus dans notre étude, nous remarquons que notre plante est très riche en alcaloïdes, composés phénoliques et tanins hydrolysables. Ainsi que la présence d'une teneur moindre des anthocyanes.

Nos résultats rejoignent les études de criblage phytochimique de **Kagnou et al., (2020)** réalisés sur les extraits de trois variétés de pervenche qui montrent que, les extraits hydro-éthanoliques ont révélé la présence des alcaloïdes, des phénols, des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, des stérols, des terpènes et des quinine dans la plupart des échantillons.

De plus, les travaux de **Kabesh et al., (2015)**, portent sur l'espèce "rosea", ont révélés pratiquement les mêmes métabolites secondaires dans les feuilles. Ces résultats concordent également avec ceux de **Rani et al., (2017)** et de **Govindasamy et Srinivasan, (2012)**. La richesse en composés actifs devrait justifier l'usage traditionnel de cette plante comme antimitotique, anti-inflammatoire, vermifuge, diurétique, antipaludique, antiasthmatique, antipaludique (**Radji et Kokou, 2013**).

IV.2-Dosage des flavonoïdes

D'après les résultats de chromatogramme d'HPLC qu'on a effectué sur l'extrait méthanolique de la pervenche. Nous avons trouvé que cette plante possède des flavonoïdes. Selon les résultats de dosage des flavonoïdes totaux effectué par **Kagnou et al., (2020)**, la pervenche possède des flavonoïdes avec des valeurs élevées et varie selon l'organe et la variété de la plante.

Une autre étude de **Mervat et al.,(2009)**, montre que la teneur totale en flavonoïdes dans la plante entière de l'extrait de la pervenche a été évalué en différentes quantités de différentes parties de la plante.

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

IV.3-Composés phénoliques

Les résultats de notre étude montrent que les teneurs en tanins totaux des extraits méthanoliques de la pervenche est plus important avec une valeur de (3.653EAT/gr MS), suivi par une valeur de (1.404 mg EAG/ gr MS) de composés phénoliques. Selon **Kagnou et al., (2020)**, les résultats du dosage des phénols totaux ont montré la présence des phénols dans les extraits des trois variétés de la pervenche avec des valeurs varies selon l'organes (fleurs, feuilles et racines). Cette disparité des teneurs en phénols au sein des différents organes de la pervenche pourrait s'expliquer par les facteurs génétiques (**Dragovicuzelac et al., 2007**).

D'après **Dewanto et al.,(2002)**, la teneur totale en phénol de l'extrait de plante entière (pousse, fleur, racine) de la pervenche « *Catharanthus roseus* » a été estimée avec diverses quantités de plante entière (pousse, fleur, racine) avec 2.135 µg/ml, 1.854 µg/ml et 1,985 µg/ml respectivement, l'acide gallique a été pris comme témoin, qui a une teneur totale en phénol de 1,652 µg/ml.

IV.4-Les activités biologiques de la pervenche

D'après les résultats présentés dans notre étude, il a été constaté que, l'extrait méthanolique de la pervenche possède une activité anti-inflammatoire considérable de valeur de (0.163mg/ml) à 50% (IC50). Ainsi, qu'une activité antioxydante proche de celle d'acide ascorbique (vitamine C) avec une valeur de (0.047mg/ml) à 50% (IC50).

Selon les résultats de **Kagnou et al., (2020)**. Le test anti-radicalaire au DPPH des extraits des organes de pervenche ont montré une intéressante capacité anti radicalaire des échantillons de fleurs, racines et feuilles avec des valeurs varies selon l'organe et la variété de la plante . De même une étude de **Belois, (1958)**, montre que, l'activité de piégeage de radicaux DPPH de différentes concentrations d'extraits méthanolique de différentes quantités de parties de plantes telles que pousses, fleurs, et racines, ont été évalué à 80,55 µg/ml, 71,15 µg/ml, 64,71 µg/ml, respectivement. L'acide ascorbique (AA) a été considéré comme contrôle positif qui a enregistré 50,21 µg/ml.

Nos résultats obtenus par le test de sensibilité et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits méthanoliques de la pervenche ont montrés une activité anti bactérienne plus importante, vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis*, *Escherichiacoli*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus*. Nos résultats sont analogues à ceux de **Kebesh k et al.,**

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

(2015), la sensibilité des souches bactériennes testées aux extraits méthanoliques de la pervenche montrent que la pervenche présente une activité antibactérienne plus importante, vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec des CMI 3,2 dans 20ul d'extrait aqueuse.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

La leucémie aigüe lymphoblastique est une pathologie fréquente nécessitant une prise en charge multi disciplinaire. Plusieurs facteurs influencent la survenue de cette hémopathie maligne, y compris les facteurs génétiques, et environnementaux.

La Pervenche de Madagascar « *Catharanthus rosea* » est l'une des plantes médicinales utilisées en chimiothérapie à cause de sa richesse en alcaloïdes, vincristine et la vinblastine qui jouent un rôle significatif dans l'arrêt de la division des cellules cancéreuses et inhibe également la polymérisation de la tubuline, en empêchant la formation des microtubules lors de la métaphase. Ainsi que sa richesse en autre composés et activités biologiques multiples.

D'après les résultats, nous avons constaté que :

- La pervenche contient des alcaloïdes, des composés phénoliques, des flavonoïdes et des tanins. Ainsi qu'une faible quantité des anthocyanes.
- Une activité anti inflammatoire et une activité antioxydante proche à celle de l'acide ascorbique.
- Une activité antibactérienne plus importante, vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus*.

Nos résultats confirment l'intérêt des alcaloïdes dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique.

La pervenche de Madagascar pourrait représenter une approche thérapeutique significative pour la leucémie aigüe lymphoblastique et autre type du cancer.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

1. Aifantis I, Raetz E, Buonamiciet S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat RevImmunol.* 8, p3.
2. Albershardt TC, Salerni BL, Soderquist RS, Bates DJ, PletnevAA, Kisselev AF, et al. (2011). Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J BiolChem*, 286, p 24882–24895.
3. Alhakmani F, Kumar S, Khan S A. (2013). 'Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringaoleifera*'. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Elsvier*, 3(8), p623-627.
4. Ashkan E, Jennie york Law. (2020). Leucémie aigüe lymphoblastique. URL : <https://www.msmanuals.com/fr/professional/h%C3%A9matologie-et-oncologie/leuc%C3%A9mies/leuc%C3%A9mie-aigu%C3%AB-lymphoblastique>
5. Aslam J, Khan SH, Siddiqui ZH, Fatima Z, Maqsood M, Bhat MA, Sekh Abdul N, Abdul Ilah, Iffat Zareen A, Saeed A K, Abdul M, Sharma MP. (2010). *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: its applications and production. *PharmGlob IJCP.* 4 (12), p1-16.
6. Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S et al. (2009). Notch1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): A Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood*, 113, p3918-3924.
7. Aziz S., Saha K, Sultana N, Nur HP, Ahsan MA, Ahmed S, Housain MK. (2016). Comparative studies of elemental composition in leaves and flowers of *Catharanthus roseus* growing in Bangladesh. *AsianPac J Trop Biomed*, 6 (1), p50-54.
8. Bates DJ, Salerni BL, Lowrey CH, Eastman A. (2011). Vinblastine sensitizes leukemia cells to cyclin-dependent kinase inhibitors, inducing acute, cell cycle phase-independent apoptosis. *Cancer Biol Ther*, 12, p314–25.
9. Ben Abdelali R, Asnafi V, Petit A et al. (2013). The prognosis of CALM-AF10-positive adult T-cell acute lymphoblastic leukemias depends on the stage of maturation arrest. *Haematologica*, 98(11), p1711-1717.
10. Benjamin R. (2017). Hôpital en tension : État des lieux dans la région Centre-Val de Loire. Thèse de doctorat en Médecine. France, p88.

11. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, (29), p 1199- 1200.
12. Bouhnoun A. (2012). Leucémie aigüelymphoblastique de l'enfant, approches thérapeutiques : étude rétrospective menée dans le centre d'hématologie et d'oncologie pédiatrique de rabat, à propos de 146 cas. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V Rabat. Maroc, p 148.
13. Boulila A *et al.* (2015). "Determination of phytochemicals and antioxydant activity of methanol extractsobtained from the fruit and leaves of Tunisian LyciumintricatumBoiss." *Food Chemistry*, n°174. p577-584.
14. Burnett A. (2005). The treatment of AML: Current status and novel approaches, *Hematology*, 10:sup1. p50-53.
15. Cécile B, Pierre H. (2015). Leucémies aiguës. *Revue du praticien*, p65.
16. Chanez B.(2018).Les protéines associées aux microtubules participent à la régulation de la migration tumorale et de la dégradation de la matrice par les cellules cancéreuses.Thèse de doctoraten Sciences. Université d'Aix-MarseilleCentre de Recherche en Cancérologie de Marseille. France, p235.
17. Cheok C Y, Chin N L, Yusof Y A, Talib R A et Law C L. (2013). "Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from Page | 6 mangosteen (*Garciniamangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments". *Industrial Crops and Products*, n°50.p1-7.
18. Clappier E, Cucchini W, Kalota A, Crinquette A, Cayuela JM, Dik WA, Langerak AW, Montpellier B, Nadel B, Walrafen P, Dellattre O, Aurias A, Leblanc T, Dombret H, Gewirtz AM, Baruchel A, Signaux F, Soulier J. (2007). The C-MYB locus isinvolved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (TALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in veryyoungchildren. *Blood*, 110 (4). p1251-1261.
19. Dewanto V, Wu x X, Adon KK, Liu RH. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture*
20. HamoudaH.Lesleucémies aigues, (2019/2020). Cours en ligne. URL :<https://fmedecine.univ-setif.dz/ProgrammeCours/13.04-%20Cours%20Leuc%C3%A9mie%20aigue.pdf>
21. El Hantatia FZ, Lobagua CH, LambertaC.(2009). Cytométrie et ses applications en immunologie clinique REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES- . N°410

22. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms,66(4), p649-661.
23. Farnault L, Boudjarane J, Baccini V R, Costello R. (2015). Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. EMC- *Hématologie*.
24. Gascoigne KE, Taylor SS. (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell*, 14(2), p111–122.
25. Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. (1999). Vincristine revisited. *Crit Rev OncolHematol*, 29(3), p267-287.
26. Haddouchi F, Chaouche T M, Halla N. (2016). « Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie ». *Phytothérapie*, <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1086-8>.
27. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. (2005). Modern diagnostics in acute leukemias. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 56(2), p 223-234.
28. [Haferlach T](#), [Schnittger S](#), [Schoch C](#). (2005). Diagnostic moderne dans les leucémies aiguës. *Elsevier*, 56(2), p223-234.
29. Hama Hamadou H et al. (2018). Criblage phytochimique et dosage des polyphénols du *Detarium microcarpum* Guillet Perrutilisé dans le traitement des maladies parasitaires au Niger ». *Afrique Science*, 14(5), p390–399.
30. Hannewald P. (2009). Substances naturelles se fixant sur la tubuline – mise en œuvre d'un criblage par spectrométrie de masse. Université Nancy, p13-21.
31. Hartmut D. (2010). «Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Adults: Recommendations from an International Expert Panel, on Behalf of the European LeukemiaNet», *Blood*, 115. p 453-474.
32. Hunger SP, Mullighan CG, (2015). Redefining ALL Classification: Toward Detecting High-Risk ALL and Implementing Precision Medicine. *Blood*. 125(26), p 3977-3987.
33. Passweg JR, Chaladon Y, Matthes T et al. (2008) . Les leucémies aiguës (mémoire imprévu) *Rev. Med. Suisse*;4, p1272-1278.
34. James W. Vardiman, [Jürgen Thiele](#), [Daniel A Arber](#), [Richard D Brunning](#), [Michael J Borowitz](#), [Anna Porwit](#), [Nancy Lee Harris](#), [Michelle M Le Beau](#), [Eva Hellström-Lindberg](#), [Ayalew Tefferi](#), [Clara D Bloomfield](#). (2009). «The 2008 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes», *Blood*, 114, no5, p937-951.

35. Jay P. Patel, Ross L. Levine. (2012). «How Do Novel Molecular Genetic Markers Influence Treatment Decisions in Acute Myeloid Leukemia?». Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. *American Society of Hematology*. Education Program, p28-34.
36. Kabesh, K, Senthilkumar P, Ragnathan R, Raj Kumar R. (2015). Analyse phytochimique de l'extrait végétal de *Catharanthus roseus* et de son activité antimicrobienne. *Int. J. Pure App. Biosci*, 3 (2), p 162-172.
37. Kagnou H, Simalou O, Tchani GW, SanveeS, Agbodan KA, Toundou O, Kpegba K. (2020). Etude phytochimique et activité antioxydante comparatives des trois variétés de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 14(6), p 2352-2361.
38. Kampen KR. (2012). The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk. Res*, 36, p6-13.
39. Kamps AW, Veerman AJP, van Wering ER, van Weerden JF, Slater R, den Berg A. (2000). Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, p1984-1991.
40. Kamps WA, Veerman AJP, van Wering ER, [van Weerden](#) JF et al. (2000). Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984–1991. *Leukemia*.v(14), p2240-2246.
41. Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ.(1995). Clinical cell biological features related to cellular drug resistance of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *LeukLymphoma*, 19. p407-416.
42. Kumar V, Palermo R, Talora, Campese AF, Checquolo S, Bellavia D et al. (2014). Notch and NF- κ B signaling pathways regulate miR223/FBXW7 axis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*;28(14), p2324-2335.
43. Leroux S. (2011). Synthèse d'alcaloïdes de *Vinca* et nouvelle approche de la synthèse de la (D)-méquitazine. Université Paris Sud-Paris XI, p14-41.
44. Letestu R, Valensi F. (2003). La ponction aspiration médullaire à visée diagnostique. *Annales de biologie clinique*, 61(6), p 655-665.
45. LiesnerRJ, Goldstone AH.(2001). ABC of clinical haematology: The acute leukaemias. *Br Med J*, 314, p 733-743.
46. Madsen M L, Due H, Ejskjær N, Jensen P, Madsen J, Dybkær K. (2019). Aspects of vincristine-induced neuropathy in hematologic malignancies: a systematic review. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 84, p 471-485.
47. Maynadiéa M, Troussardb X. (2015). Épidémiologie des leucémies aiguës. *Revue Francophone des Laboratoires*. (471), p29-33.

48. Mervat MM, FarEI, Taie H. (2009). Antioxidant activities, total anthocyanins, phenolics and flavonoids contents of some sweet potato genotypes under stress of different concentrations of sucrose and sorbitol. *Australian Journal of Basic Applied Science*. 3 (4), p 3609-3616.
49. Michele Imbert a place du biologiste dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue française des laboratoires*, juin 2002, N°344, 67-70
50. Miyazaki T, Yokoshima S, Simizu S, Osada H, Tokuyama H, Fukuyama T. Total Synthesis of Vinblastine by Fukuyama [Internet]. 2007 [cited 13 Nov 2017]. URL: <http://www.organicchemistry.org/totalsynthesis/totsyn03/vinblastine-fukuyama.shtml>
51. Mullighan CG. (2009). Mutations of NOTCH1, FBXW7, and prognosis in T lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 94(10), p1338-1340
52. Naghmeh N, Valdiani A, Cahill D, Tan Y-H, Maziah M, Abiri R. (2015). Ornamental Exterior versus Therapeutic Interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): The Two Faces of a Versatile Herb. *Scientific World Journal*, p1-19.
53. Noble R L. (1990). *Biochem. Cell Biol*, 68 (12), p1344-1351.
54. O'Neil J, Grim J, Strack P et al. (2007). FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*, 204(8), p1813-1824.
55. Paganin M, Ferrando. (2011). Molecular pathogenesis and targeted therapies for Notch1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev*; 25(2), p83- 90.
56. Polshettiwar SA, Ganjiwale RO, Wadher SJ, Yeole PG. (2007). "Spectrophotometric estimation of total tannins in some ayurvedic eye drops". *Indian J Pharm Sci*, 69, p574-576.
57. Poplack DG, Hoffman R, Benz EJ Jr, Shot Shaattil SJ, Furie B, Cohen HJ. (1999). *Til Clinical manifestations of acute lymphoblastic leukemia Hematology basic principles and practice New York: Churchill livingstone*, p776-784.
58. Ribera JM. (2011). Advances in acute lymphoblastic leukemia in adults. *Hematologic malignancies*, 23, p692-699.
59. Rizvi NF, Weaver JD, Cram EJ, Lee-Parsons CWT, Parsons L. (2016). Silencing the Transcriptional Repressor, ZCT1, Illustrates the Tight Regulation of Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus* Hairy Roots. *PLOS ONE*, 11(7), p1-17.
60. Salerni BL, Bates DJ, Albershardt TC, Lowrey CH, Eastman A. (2010). Vinblastine induces acute, cell cycle phase-independent apoptosis in some leukemias and lymphomas and can induce acute apoptosis in others when Mcl-1 is suppressed. *Mol Cancer Ther*, 9, p791-802.

61. Sanghvi VR, mavrakis KJ, van Der Meulen J, Boise M et al. (2014). Characterization of a set of tumor suppressor micro RNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *SciSignal*; 7, p111.
62. Soulier J, Clappier E, Cayula JM, Regnault A et al (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*, 106, p 274-286.
63. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T et al. (2007). The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp*, 204 (8), p1825-1835.
64. Tzoneva G, Ferrando AA. (2012). Recent advances on Notch signaling in T-ALL. *Curr Top MicrobiolImmunol*, 360, p163-182.
65. Valensi F (2003). Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé, Encyclopédie Médico-Chirurgicale 13-018-G-05.
66. Van der Meulen J, Van roy N, Van Vlierberghe P, Speleman F. (2014).The epigenetic landscape of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J BiochemCellBiol*, 53, p547-557.
67. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, Kerrsmaecker KD, et al. (2013). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,122 (1), p74-82.
68. Van Vlierberghe P, Fernando A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 122 (10), p3398-3406.
69. Van Vlierberghe P, Pieters R, BerenaBeverloo H, Meijerink. (2008). Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 143, p153-168
70. Zakariya I, Moutaouakkil Y, Nchinech N, Maghous A, Fettah H, Nejjari R, et El Guessabi L. (2017). Les alcaloïdesanticancereux de la pervenche de Madagascar the alkaloids anticancer of Madagascar periwinkle plant. *Journal Marocain des Sciences Médicales*, 21(1).
71. Zhishen J, MengchengT, Jianming W. (1999).“The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals”. *Food Chemistry*, 64, p55.
72. Zhou MH, Yang QM. (2014). NUP214 fusion genes in acute leukemia (Review). *OncolLett*, 8(3), p959-962

ANNEXES

ANNEXE 1

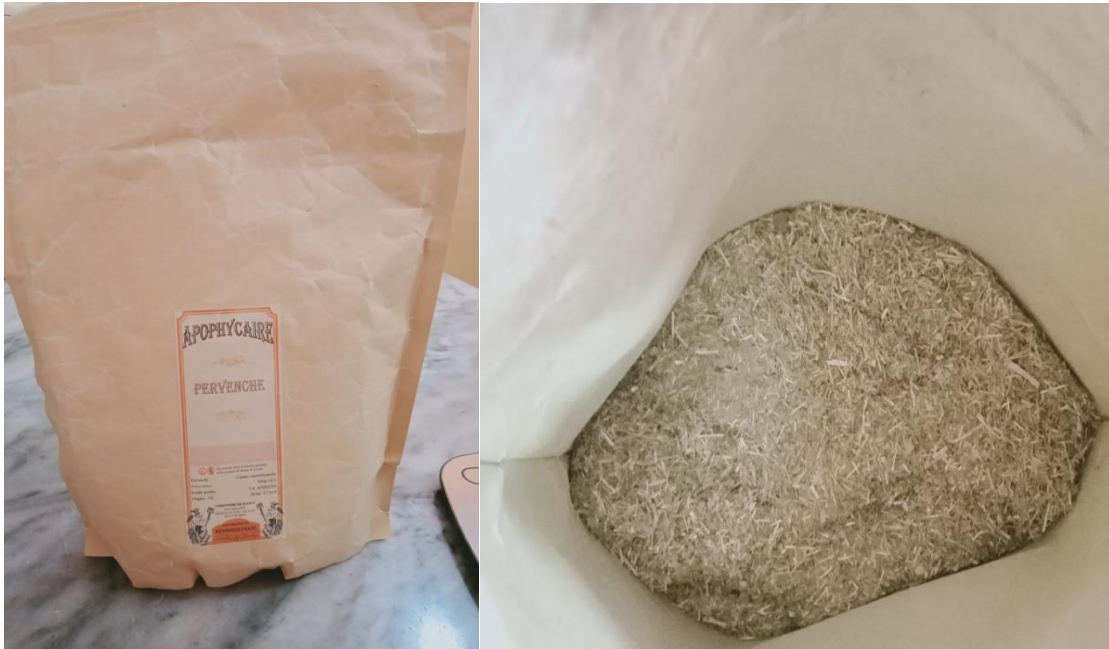


Figure 1 :La pervenche en poudre

ANNEXES 2

Tableau I:Matérielnon Biologique

| Appareillage | Matériels et verreries | Réactifs |
|--|---|---|
| -Bain -marie -Decteur UV -Erlenmeyer -HPLC Shimadzu -Spectrométrie SHIMADZU UV -1202 | -Boîte Pétri -Disque De Papier Stériles -EcovillonSterile -Entonnoire -Fiole Jaugées -Micro-tube -Tube à essai -Tube Stérile -Verre De Montre | -Acétate De Sodium -Acide gallique -Acide sulfurique -Acide Tannique -Acide-Acétysalicylique -Alcool Amylique Ou Isoamylique -Alcool Chlorohydrique -Bouchardat -Carbonate De Sodium -Carbonate De Sodium (-Na ₂ CO ₃) -DMSO -Dragendorff -Eau Bouillante -Eau Chaud eau -physiologique -Eau Distille-tampon PBS -FeCl ₃ -FolinCiocalteu -Folin -Denis(RFD) -H ₂ SO ₄ -HCL -Magnesium -Mayer -Méthanol -Muller-Hinton Liquide -NH ₄ OH -Nitrite de sodium(NANO ₂) - DPPH -la Soude Ou Ammoniaque -Stiasney -Trichlorure d'aluminium |

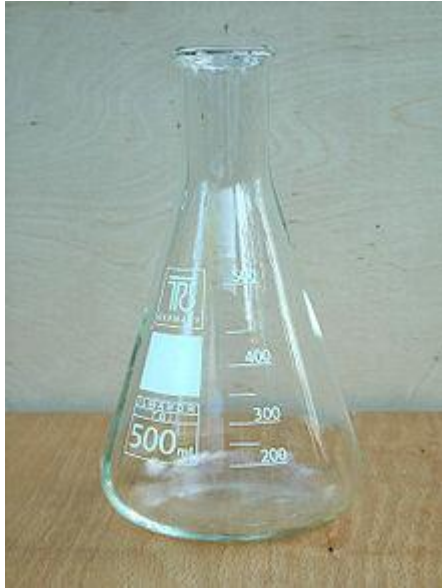


Figure 2.Erlenmeyer



Figure 3.Bain Marie



Figure 4.Ecouvillon



Figure 5.Fiole Jugée



Figure 6.Entonnoire



Figure 7.Dragondroff



Figure 8.Acide sulfurique



Figure 9. Mayer



Figure 10.Acétate de Sodium



Figure 11.Acide Chlorhydrique



Figure 12.FolinCiocalteu



Figure 13.Acide Tannique



Figure 14.DPHH



Figure 15.Acide Salicylique



Figure 16.Spectrométrie SHIMADZU

ANNEXE 3

| Matériel Et Verrerie | Réactif |
|--|-----------------------|
| Mortier Un Verre A Pied Un Cristalliseur | Alcool EauDéstille |

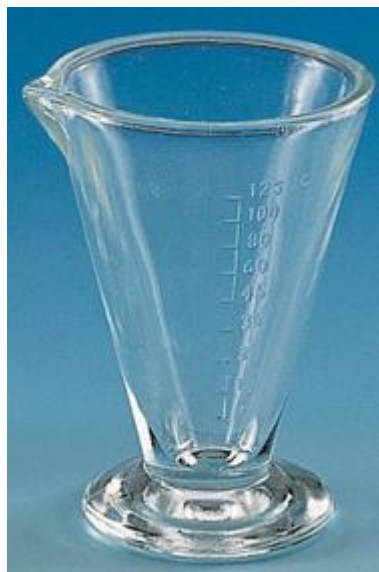


Figure 17. Un verre Api



Figure 18. Broyeur à mortier



Figure 19. Cristalliseur

