

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

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 05/BA/2022
N° de série : 79/D3C/2022



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : **Immunologie Cellulaire et Moléculaire**

Présentée et soutenu par :

Ryma MOUNA

Intitulé :

**Profils phytochimiques LC-HRMS/MS et évaluation des activités
antioxydante, anticholinestérase et anticancéreuse d'extraits et de
fractions VLC de deux espèces du genre *Linum* (Linaceae)**

Soutenue publiquement le 19/09/2022

Membres du jury :

Président :

Ibtissam EL OUAR Prof. **Université des frères Mentouri-Constantine 1**

Directeur de thèse :

Zahia KABOUCHE Prof. **Université des frères Mentouri-Constantine 1**

Examineurs :

Alexis BROISAT MCA **Université Grenoble Alpes (France)**
Naima BOUTAGHANE MCA **Université des frères Mentouri-Constantine 1**
Abdelmalik BELKHIRI Prof. **Université Salah Boubnider-Constantine 3**

Année universitaire : 2021/2022

Au nom de Dieu : celui qui fait miséricorde, le Miséricordieux

Louange à Dieu Seigneur des mondes, qui par sa grâce, m'a donné, la santé, le courage, la force et la volonté pour accomplir ma thèse.

À mes adorables parents pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma carrière universitaire.

J'espère que vous trouvez dans ce travail ma reconnaissance.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, Université des frères Mentouri-Constantine 1, sous la direction du Professeur Zahia KABOUCHE, et le Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (LRB), Faculté de médecine, Université de Grenoble Alpes, sous la direction du Professeur Catherine Ghezzi.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse le Professeure Zahia KABOUCHE pour sa patience, ses commentaires, ses conseils, et pour sa contribution à la réussite de ce travail.

Avec un grand plaisir et un profond sentiment de gratitude, j'adresse mes remerciements les plus cordiaux et les plus humbles à la Pr. Catherine Ghezzi pour m'avoir accueillie au sein du son laboratoire sans lequel certaines parties de cette étude auraient été impossibles à mener.

J'adresse également mes sincères remerciements au Dr. Alexis Broisat pour tout le temps qu'il m'a accordé, et de m'avoir donné l'opportunité de me former et pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également aux membres de jury qui ont accepté d'examiner ce travail :

Le professeur Ibtissam EL OUAR, de l'Université des frères Mentouri-Constantine 1

Docteur Alexis BROISAT, de l'Université Grenoble Alpes, France

Docteur Naima BOUTAGHANE, de l'Université des frères Mentouri-Constantine 1

Professeur Abdelmalik BELKHIRI, de l'Université Salah Bounider-Constantine 3

Je remercie également tous les membres du laboratoire LRB pour les facilités accordées pour la réalisation de mon travail.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues du laboratoire LOST avec lesquels les échanges des conseils et suggestions m'ont aidées à réaliser mes travaux, plus particulièrement le Dr. Abbes BENMERACHE, et le Dr. Ramzi MAADADI.

Un profond merci à mes amis pour leur soutien et leurs souvenirs inoubliables et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel

Enfin, Je tiens à remercier DGRSDT-MESRS, Algérie et Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (LRB), France pour leur soutien financier.

Ryma

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

I.Introduction..... 1

Partie I. Revue bibliographique

Chapitre I. Aperçu bibliographique sur le genre *Linum*

I.1 La famille des Linaceae 3

I.2 Genre *Linum*..... 3

I.2.1 Généralités 3

I.2.2 Description du genre *Linum*..... 4

I.2.3 Position taxonomique du genre *Linum* 5

I.2.4 *Linum trigynum* L. 7

I.2.5 *Linum numidicum* Murb..... 8

I.3 Métabolites secondaires et activités biologiques du genre *Linum* (extraits des parties aériennes et racinaires) 9

I.4 Etudes chimiques antérieures sur le genre *Linum*..... 10

I.4.1 Les flavonoïdes 10

I.4.2 Les lignanes 15

I.4.3 Autres composés 20

Chapitre II. Activites antioxydante et anticholinésterase

II.1. Les antioxydants 21

II.2 Les anticholinestérases 22

Chapitre III. Biologie du cancer

III.1 Cancer..... 23

III.1.1 Données épidémiologiques 23

III.1.2 Caractéristiques du cancer 24

III.1.3 Processus de cancérogenèse 25

III.2 Cycle cellulaire..... 27

III.2.1 Régulation du cycle cellulaire 28

III.2.1.1 Les complexes cyclines/CDK 28

III.2.1.2 Les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (CKI_s)..... 28

III.2.2 Points de contrôle du cycle cellulaire..... 31

III.2.2.1 Point de contrôle G1/S 31

III.2.2.2 Point de contrôle G2/M 32

III.2.2.3 Point de contrôle intra-S..... 34

III.2.2.4 Point de contrôle du fuseau (transition métaphase-anaphase).....	35
III.3 L'apoptose.....	36
III.3.1 Les voies de signalisation de l'apoptose.....	37
III.3.1.1 La voie intrinsèque.....	37
III.3.1.2 La voie extrinsèque.....	38
III.3.1.3 La voie perforine/granzyme.....	39
III.3.2 Modulateurs de l'apoptose.....	40
III.3.2.1 Les caspases.....	40
III.3.2.2 Famille de protéines Bcl-2.....	42
III.4 Traitements du cancer.....	45

Chapitre IV. Chromatographie liquide et ses couplages

IV .1 Chromatographie liquide.....	47
IV.1.1 Généralités.....	47
IV.1.2 Chromatographie liquide à haute performance.....	47
IV.2 Spectrométrie de masse.....	48
IV.3 LC-MS.....	49
IV.3.1 Domaines d'application de LC-MS.....	50
IV.3.2 Avantages et inconvénients de LC-MS.....	51
IV.4 Chromatographie liquide Spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).....	52
IV.4.1 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	52
IV.4.1.1 Spectromètres de masse triple quadripôle (QqQ).....	53
IV.4.1.2 Spectromètre de masse Q-TOF.....	55
IV.4.1.3 Spectromètre quadripôle-Orbitrap (Q-Orbitrap).....	56

Partie II. Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	58
I.1 Récolte du matériel végétal.....	58
I.2 Les étapes d'extraction des parties aériennes de <i>L. numidicum</i> et <i>L. trigynum</i>	58
I.3 Fractionnement d'EBLN par chromatographie liquide sous vide (VLC).....	60
II. Détermination de la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes de l'EAELN et l'EAEL.....	61
II.1.1 Dosage des polyphénols.....	61
II.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	62
III. Activité antioxydante et anticholinestérase de l'EAELN et l'EAELT.....	62
III.1 Activité antioxydante.....	62
III.1.1 Piégeage du radical libre DPPH.....	63
III.1.2 Piégeage du radical libre ABTS ⁺	64
III.1.3 Test de réduction du cuivre (CUPRAC).....	65
III.1.4 Piégeage du radical galvinoxyle (GOR).....	66
III.1.5 Test phénanthroline.....	67
III.2 Activité anticholinestérase.....	69
IV. Activité anticancéreuse.....	70

IV.1 Préparation des échantillons.....	70
IV.2 Culture de cellules.....	70
IV.3 Test MTT	73
IV.4 Test d'apoptose.....	74
IV.5 Analyse du cycle cellulaire	76
V. LC-ESI-DDA-HRMS/MS	78
V.1 Préparation des échantillons.....	78
V.2 L'acquisition des données.....	78
V.3 Paramètres de prétraitement des données.....	79
V.4 Identification des métabolites.....	80
VI. Analyses statistiques	80

Partie III. Résultats et discussion

I.Résultats.....	81
I.1 Rendements d'extraction	81
I.2 Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux de l'EAELN et l'EAELT.....	81
I.3 Activité antioxydante de l'EAELN et l'EAELT.....	82
I.3.1 Piégeage du radical libre DPPH•	82
I.3.2 Piégeage du radical libre ABTS •+	84
I.3.3 Test de réduction du cuivre (CUPRAC)	85
I.3.4 Piégeage du radical galvinoxyle (GOR)	87
I.3.5 Test phénanthroline.....	88
I.4 Activité anticholinestérase de l'EAELN et l'EAELT.....	90
I.5 Activité anticancéreuse	92
I.5.1 Activité antiprolifératif	92
I.5.1.1 Effet antiprolifératif de l'EAELN et l'EAELT sur les lignées cellulaires PC3 et MDA-MB-231.....	92
I.5.1.2 Effet antiprolifératif des fractions VLC de l'EBLN (F1-F6) sur les cellules PC3 et MDA-MB-231.....	95
I.5.2 Activité apoptotique.....	97
I.5.2.1 Induction de l'apoptose des cellules PC3 par l'EAELN et l'EAELT.....	97
I.5.2.2 Induction de l'apoptose des cellules PC3 par F1 et F6.....	102
I.5.3 Induction de l'arrêt du cycle cellulaire des cellules PC3 par l'EAELN et l'EAELT.....	107
I.6 Analyses LC-HRMS/MS	111
I.6.1 Analyses LC-HRMS/MS de l'EAELN et de l'EAELT.....	111
I.6.1.1 Composition phytochimique de l'EAELN et l'EAELT.....	120
I.6.1.1.1 Composés détectés dans l'EAELN	121
I.6.1.1.2 Composés détectés dans l'EAELT.....	122
I.6.2 Analyses LC-HRMS/MS de F1 et F6	123
I.6.2.1 Composition phytochimique de F1 et F6.....	131

I.6.2.1.1 Composés détectés dans F1	133
I.6.2.1.2 Composés détectés dans F6	133
II.Discussion.....	134
Conclusion générale	145
Références bibliographiques	147
Publications scientifiques	

Liste des figures

Figure 1. Carte géographique du genre <i>Linum</i>	5
Figure 2. Phylogénie STAR des 11 espèces de <i>Linum</i> construit à partir de 413 arbres génétiques.....	6
Figure 3. Photos de la plante <i>Linum trigynum</i> L.	7
Figure 4. Photos de la plante <i>Linum numidicum</i> Murb.	8
Figures 5. Structure du squelette de base des flavonoïdes et leurs classes.....	11
Figure 6. Structures des flavonoïdes isolés du genre <i>Linum</i>	14
Figure 7. Dimérisation des phénylpropanoïdes - lignane et néolignane.	15
Figure 8. Les groupes structuraux de lignanes.	16
Figure 9. Structure des lignanes aryltétralines isolés du genre <i>Linum</i>	18
Figure 10. Structure des lignanes arylnaphthalènes isolés du genre <i>Linum</i>	19
Figure 11. Structure des lignanes aryldihydronaphthalènes isolés du genre <i>Linum</i>	20
Figure 12. Nombre de décès en 2020, les deux sexes, tous âges	23
Figure 13. Nombre de nouveaux cas en 2020, les deux sexes, tous âges.....	24
Figure 14. Les caractéristiques biologiques du cancer.....	25
Figure 15. Phases de cancérogenèse : initiation, promotion, progression et métastase.	26
Figure 16. Régulation moléculaire du cycle cellulaire.....	29
Figure 17. Régulation de la transition G1/S par les CKI _s	31
Figure 18. Schéma simplifié des voies de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN	34
Figure 19. Facteurs contrôlant la transition métaphase-anaphase.....	36
Figure 20. Les voies d'activation de l'apoptose, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. ..	39
Figure 21. La voie perforine/granzymes	40
Figure 22. Structure des caspases.....	41
Figure 23. Mécanisme d'activation des caspases.....	42
Figure 24. Les protéines de la famille Bcl-2	43
Figure 25. Les principales stratégies utilisées dans le traitement des cancers	46
Figure 26. Domaines d'application de la technique LC-M.	51
Figure 27. Caractéristiques vitesse et résolution de masse des spectromètres de masse en tandem les plus fréquents	53
Figure 28. Spectrométrie de masse triple quadripôle (QqQ).....	54
Figure 29. Principe de l'analyse LC-QqQ-MS/MS (ionisation par electrospray en mode positif (ESI+)).....	55
Figure 30. Spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF)	56
Figure 31. Spectromètre de masse hybride Quadripôle/Orbitrap	57
Figure 32. Protocole d'extraction.....	59
Figure 33. Schéma de fractionnement de l'EBLN	61
Figure 34. Transformation du radical DPPH• en DPPHH	63
Figure 35. Réaction chimique ABTS ^{•+} avec un composé antioxydant	64
Figure 36. Mécanisme de réaction de la capacité antioxydante par réduction de cuivre	66

Figure 37. Structure chimique du radical galvinoxyle	67
Figure 38. Réaction de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² -phénanthroline	68
Figure 39. Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman.....	69
Figure 40. Clichés de cellules MDA-MB-231 observées par microscopie optique en contraste de phase	71
Figure 41. Clichés de cellules PC3 observées par microscopie optique en contraste de phase	72
Figure 42. Transformation de MTT en formazan par la succinate déshydrogénase.....	73
Figure 43. Détection de l'apoptose par coloration à l'annexine V et au IP.....	75
Figure 44. Histogramme d'ADN obtenu par cytométrie en flux après marquage par IP.....	77
Figure 45. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.	83
Figure 46. Pourcentages d'inhibition du radical libres ABTS •+ en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT	85
Figure 47. Absorbance CUPRAC en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.....	86
Figure 48. Pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyle en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.	88
Figure 49. Absorbance du complexe Fe ²⁺ -phénanthroline en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT	89
Figure 50. Pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT	91
Figure 51. Pourcentages d'inhibition de la BChE en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT	91
Figure 52. Effets dose-dépendants de l'EAELN et de l'EAELT sur la viabilité des cellules cancéreuses PC3 (A) et MDA-MB-231 (B).....	94
Figure 53. Effet dose-dépendant de F1 et F6 sur la viabilité des cellules cancéreuses..... (A) PC3, (B) MDA-MB-231.....	96
Figure 54. Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses PC3 par l'EAELN.....	98
Figure 55. Quantification des cellules apoptotiques après traitement avec l'EAELN.....	99
Figure 56. Induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses PC3 par l'EAELT.....	100
Figure 57. Quantification des cellules apoptotiques après traitement avec EAELN.	101
Figure 58. Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses PC3 par F1.....	103
Figure 59. Quantification des cellules apoptotiques (PC3) après traitement avec F1.....	104
Figure 60. Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses PC3 par F6.....	105
Figure 61. Quantification des cellules apoptotiques (PC3) après traitement avec F6.....	106
Figure 62. Distribution des cellules PC3 dans les phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) après traitement avec l'EAELN.	108
Figure 63. Histogramme de la distribution du cycle cellulaire (%) dans les cellules PC3 traitées avec l'EAELN.	109
Figure 64. Distribution des cellules PC3 dans les phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) après traitement avec l'EAELT.....	110
Figure 65. Histogramme de la distribution du cycle cellulaire (%) dans les cellules PC3 traitées avec l'EAELT.	111

Figure 66. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELN en mode ions négatifs.	112
Figure 67. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELN en mode ions positifs.	113
Figure 68. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELT en mode ions négatifs.....	114
Figure 69. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELT en mode ions positifs..	115
Figure 70. Composition phytochimique de l'EAELN et de l'EAELT.....	120
Figure 71. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F1 en mode ions négatifs.....	124
Figure 72. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F1 en mode ions positifs.	125
Figure 73. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F6 en mode ions négatifs.....	126
Figure 74. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F6 en mode ions positifs.	127
Figure 75. Composition phytochimique de F1.	132
Figure 76. Composition phytochimique de F6.	132

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques Activités biologiques reconnues du genre <i>Linum</i>	9
Tableau 2. Distribution des flavonoïdes dans le genre <i>Linum</i>	11
Tableau 3. Distribution des lignanes aryltétralines dans le genre <i>Linum</i>	17
Tableau 4. Distribution des lignanes arylnaphthalènes dans le genre <i>Linum</i>	19
Tableau 5. Distribution des lignanes aryldihydronaphthalènes dans le genre <i>Linum</i>	20
Tableau 6. Rendement d'extraction de <i>L. numidicum</i> et <i>L. trigynum</i>	81
Tableau 7. Teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes de l'EAELN et l'EAELT	82
Tableau 8. Valeurs IC ₅₀ (µg/mL) d'inhibition du DPPH•	83
Tableau 9. Valeurs IC ₅₀ (µg/mL) d'inhibition d'ABTS•+	84
Tableau 10. Valeurs A _{0,50} de réduction cuprique	86
Tableau 11. Valeurs IC ₅₀ (µg/mL) de piégeage des GOR.....	87
Tableau 12. Valeurs A _{0,50} du complexe Fe ²⁺ -phénanthroline.....	89
Tableau 13. Valeurs IC ₅₀ d'inhibition de l'AChE et BChE	90
Tableau 14. Valeurs IC ₅₀ (µg/mL) de l'EAELN et l'EAELT contre la lignée PC3 et MDA-MB-231	93
Tableau 15. Valeurs IC ₅₀ (µg/mL) des fractions VLC de l'EBLN contre la lignée PC3 et MDA-MB231	95
Tableau 16. Composés caractérisés par des analyses LC-RHMS/MS dans l'EAELN et l'EAELT	116
Tableau 17. Composés caractérisés par des analyses LC-RHMS/MS dans F1 et F6 de l'EBLN	128

Liste des abréviations

- A_{0.50}** : Concentration à l'absorbance 0.5
- ABTS** : 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- AChE** : Acétylcholinestérase
- AcOEt** : Acetate d'éthyle
- ATCC** : American Type Culture Collection
- BChE** : Butyrylcholinestérase
- BHA** : ButylHydroxyAnisole
- BHT** : ButylHydroxyToluene
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CI₅₀** : Concentration Inhibitrice à 50%
- CID** : Collision-induced dissociation
- CUPRAC** : Cupric Reducing Antioxidant Capacity
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO** : Diméthyl Sulfoxyde
- DPPH** : 1, 1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl
- DTNB** : 5, 5'-Dithiobis-(2 nitrobenzoïque acide)
- EAELN** : Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*
- EAELT** : Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*
- EBLN** : Extrait *n*-BuOH de *L. numidicum* Murb.
- EDTA** : Ethylenediamine tetraacetic acid
- EP** : Ether de pétrole

EtOH : Ethanol

F : Fraction

FBS : Fetal Bovine Serum

FCR : Folin- Ciocâlțeu Reagent

FITC : Fluorescine isothiocyanate-5

GNPS : Global Natural Products Social Molecular Netorking

GOR : Galvinoxyl Radical

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IP: Iodure de Propidium

LC-HRMS/MS : Liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry

m/z : masse/charge d'un ion

MeOH : Méthanol

MS : Spectrométrie de Masse

MTT : bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium

n-BuOH : Butanol

NC : Néocuproïne

R% : Rendement en %

RP-18 : Silice greffée C-18

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

TR : Temps de Rétention

UV : Ultra-Violet

VLC : Chromatographie liquide sous vide

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes sont utilisées comme médicament et thérapie depuis plus de 5000 ans. Elles sont connues comme une riche source d'excellents et puissants composés bioactifs, qui peuvent être utilisés directement ou indirectement comme médicaments pour la prévention des maladies et des affections. Plusieurs plantes se sont avérées avoir divers types d'activités biologiques, selon les données actuelles, le règne végétal contient près de 250 000 espèces végétales, dont seulement environ 10 % des plantes médicinales ont été étudiées/découvertes jusqu'à présent pour le traitement de nombreuses maladies (Fridlender et al., 2015 ; Siddiqui et al., 2022)

La flore Algérienne est caractérisée par une forte proportion de plantes endémiques (Greuter et al., 1991), malgré le nombre de composés bioactifs qui existent, il reste nécessaire de découvrir des composés thérapeutiques et protecteurs originaux actifs. Les composés phénoliques constituent le groupe le plus important de composés naturels ; antioxydants, antiprolifératifs et anti-inflammatoires ces effets sont essentiels pour prévenir ou traiter les troubles neurodégénératifs, le cancer, les maladies cardiovasculaires et (Arts & Hollman., 2005 ; Crozier et al., 2009).

Le genre *Linum* (Linaceae) comprend plus de 200 espèces réparties dans le monde entier (Rogers, 1982). Plusieurs études ont rapporté que les espèces de *Linum* pourraient inhiber la croissance de divers types de lignées cellulaires cancéreuses par l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Akbari et al., 2018; Alejandre-García et al., 2015; Amirghofran et al. 2006; Mohammed et al. 2010)

Le développement de médicaments anticancéreux et de stratégies de traitement plus efficaces pour améliorer la qualité de vie des patients est d'une grande importance dans le domaine d'oncologie. Les traitements anticancéreux actuels, tels que la chimiothérapie et la radiothérapie, présentent des inconvénients, notamment de fortes toxicités systémiques et des irritations locales (Huncharek et al., 2001; Shibata et al., 1990). En outre, la résistance aux médicaments anticancéreux et les résultats indésirables de la radiothérapie (Jabir et al., 2018; Lee et al., 2018) soulignent le besoin urgent de découvrir de nouveaux agents moins toxiques avec une plus grande efficacité clinique (Lee et al., 2003; Newman & Cragg, 2007).

L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et l'induction de l'apoptose par les produits phytochimiques sont considérées comme une caractéristique prometteuse des médicaments chimiothérapeutiques (Gurumurthy et al., 2001; Lowe & Lin, 2000). Actuellement, la grande majorité des médicaments anticancéreux disponibles sont des produits naturels ou leurs dérivés, comme le taxol, la vinblastine, la vincristine, la camptothécine (Newman & Cragg, 2007; Newman et al., 2003; Ojima, 2008).

C'est dans ce but que s'inscrivent nos travaux qui consistent, d'une part, à identifier les métabolites secondaires de deux plantes médicinales poussant en Algérie de genre *Linum* et d'en étudier leurs effets biologiques d'autre part.

Ces travaux sont décrits dans ce manuscrit divisé en trois parties

La première partie, comporte quatre chapitres, Le premier chapitre de cette partie est un aperçu bibliographique sur la famille des Linaceae et le genre *Linum* portant sur l'aspect botanique, les activités biologiques et les différentes classes de métabolites antérieurement isolés du genre *Linum*. Le deuxième a été consacré aux généralités sur les activités, antioxydante et anticholinestérase. Le troisième chapitre comprend des généralités sur le cancer, le cycle cellulaire et la mort cellulaire. Le quatrième chapitre a été consacré aux généralités sur la chromatographie liquide et ses couplages.

La deuxième partie apporte tous les détails expérimentaux entrepris tout au long de ce travail de recherche, description du matériel végétal, la méthode d'extraction et d'identification de métabolites secondaires par LC-HRMS/MS ainsi que les méthodes d'évaluation des activités antioxydante, anticholinestérase, antiproliférative, apoptotique et d'analyse du cycle cellulaire.

La dernière partie comprend les résultats obtenus de l'étude phytochimique des deux espèces de *Linum*, les résultats de l'analyse LC-HRMS/MS plus les résultats de l'activité antioxydante, anticholinestérase, antiproliférative, apoptotique et induction de l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que leur discussion

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

Partie I
Revue bibliographique

Chapitre I. Aperçu bibliographique sur le genre *Linum*

I.1 La famille des Linaceae

La famille des Linaceae également appelée la famille du lin est une famille de plante à fleurs herbacées annuelles ou vivaces bien que certaines espèces soient des arbustes ligneux, des sous-arbustes et de petits arbres avec une distribution presque cosmopolite, répartie dans les régions tempérées et tropicales du monde. Elle comprend environ 260 espèces réparties en 14 genres et en deux sous-familles: Hugonioideae et Linoideae (Dressler et al., 2014), Linoideae est la plus grande sous-famille, avec environ 210 espèces sur huit genres, dont *Linum*, comme genre type de la famille avec le nombre le plus élevé d'espèces (Barrera-Robles et al., 2020; Raj et al., 2022).

Les Linaceae se caractérisent par des feuilles simples généralement alternes mais parfois verticillées ou opposées, des tiges minces, les fleurs sont hermaphrodites, actinomorphes et pentamères, rarement tétramères (chez *Radiola* Hill. et une espèce de *Linum* L.), pétales libres ou connés à la base, sont convolutés et généralement rapidement caducs, étamines à filaments libres ou connés à la base en une structure en forme de coupe entourant la base de l'ovaire supère. L'ovaire est syncarpe, généralement composé de 2-5 carpelles biovulés, les membres des Linaceae sont également caractérisés par la présence de l'obturateur placentaire (McDILL, & Simpson, 2011). Fruit une drupe ou une capsule (parfois avec méricarpes indéhiscent). Graine non persistante, à arillode peu ou pas développée (Van Hooren & Nootboom, 1984).

I.2 Genre *Linum*

I.2.1 Généralités

Le genre *Linum* de la famille des linacées comprend plus de 230 espèces réparties dans le monde (Figure 1) (Heywood, 1979), la plus célèbre étant *L. usitatissimum*, la source du lin et d'huile de lin.

Les profils phytochimiques qui ont été signalés pour les espèces de *Linum* suggèrent la présence de certains métabolites secondaires de type lignane (Vasilev et al., 2008). Ces types de composés constituent un groupe important de produits naturels qui présentent divers effets biologiques.

Les lignanes peuvent servir de composés principaux pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques ayant une activité anti-angiogénique, anti-lymphatique, antirhumatisme, antipsoriasis, antiasthmatique, hypolipidémique, antifongique et antivirale (Iwasaki et al.,1996; Ayers & Loike,1990). Cependant, les activités cytotoxiques et antitumorales sont d'un intérêt majeur sur ces types de lignanes (Ayers & Loike, 1990).

I.2.2 Description du genre *Linum*

Le genre *Linum* est le principal représentant de la famille des Linaceae, sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, à tige grêle; feuilles alternes (feuilles supérieures), opposées (feuilles inférieures) (Quézel & Santa,1962) , sessiles, étroites, simples, souvent linéaires, généralement entière avec ou sans glandes stipulaire; fleurs à pédicelle court, inflorescence cymeuse ou paniculée, parfois racémeuse, généralement pentamères portées sur des grappes terminales ou axillaires, les fleurs peuvent être de couleurs différentes: bleues, jaunes, rouges ou blanches, cinq pétales, séparés, alambiqués, tombant rapidement après l'anthèse; cinq sépales, imbriqués, plus fréquemment, tous avec des dents glandulaires marginales; parfois entiers ou légèrement dentelés, cinq étamines, réunies à la base, avec ou sans staminodes diminutifs intermédiaires; ovaires à cinq ou dix cellules (selon l'absence ou la présence de faux septums), à deux ovules par cellule, cinq styles, séparés ou unis; fruit capsulaire ovale, déhiscente en dix segments à une graine; graines brillantes, brun rougeâtre, oléagineuses, sans endosperme (ou avec très peu) (Cullis, 2011; Rogers, 1981).

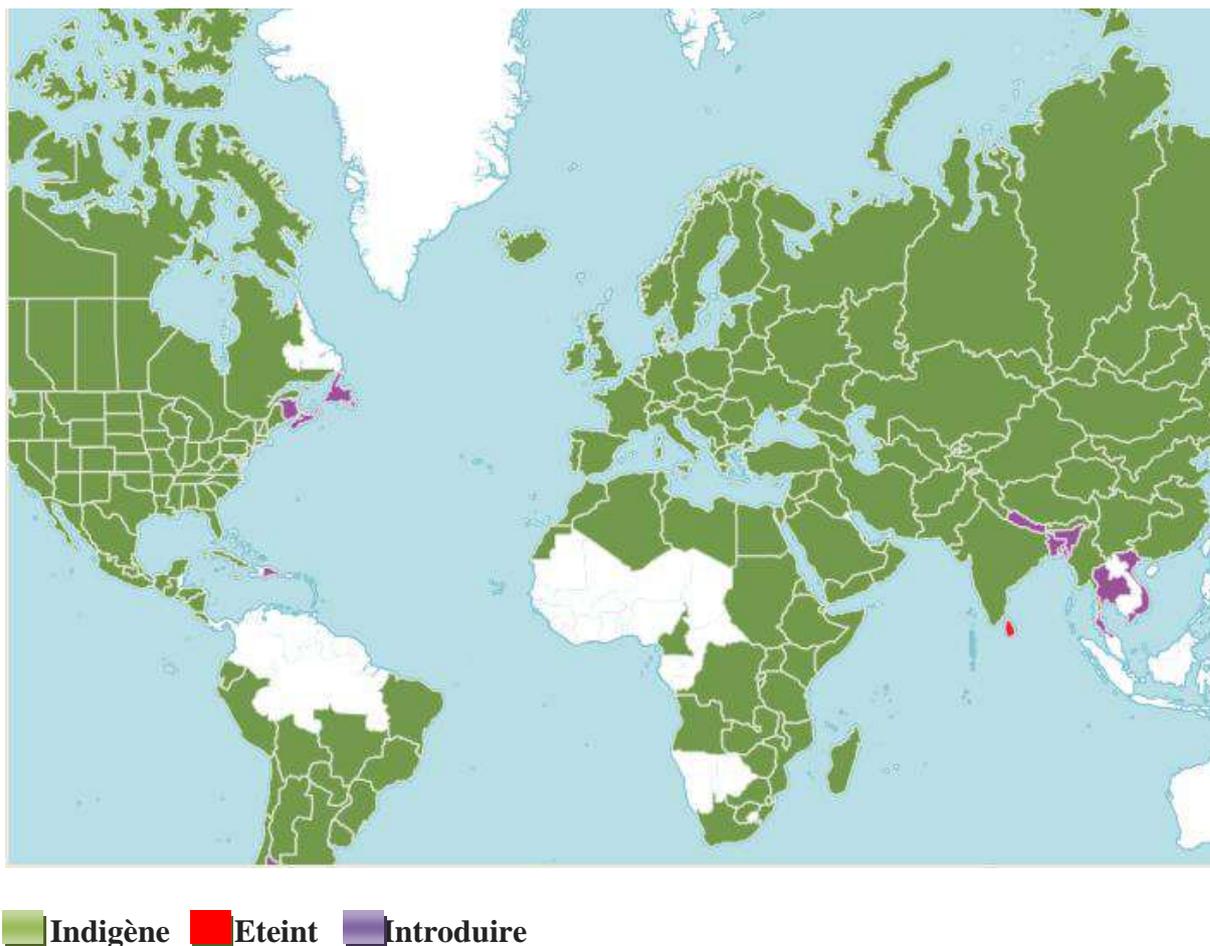


Figure 1. Carte géographique du genre *Linum* [R1]

I.2.3 Position taxonomique du genre *Linum*

Le genre *Linum* est divisé pour des raisons de taxonomie classique en cinq sections, *Linum*, *Linopsis* (*Linastrum*), *Cathartolinum*, *Dasylinum* et *Syllinum* (Winkler, 1931), Ockendon et Walters (1968) ont ajouté une section supplémentaire, *Cliococca*. Le lin cultivé, *Linum usitatissimum*, est placé dans la section *Linum*.

Il n'y a pas de schéma de classification unique pour le genre *Linum*, la taxonomie et la classification ont changé avec l'accroissement des connaissances, plusieurs chercheurs ont classé les espèces de *Linum* selon les caractères morphologiques ou leur distribution géographique, d'autres chercheurs les ont regroupés en fonction du nombre de chromosomes. Récemment la phylogénie moléculaire de *Linum* est largement étudiée (McDill et al., 2009),

il existe deux clades principaux (Figure 2), un grand clade à fleurs bleues prédominantes contenant les sections *Linum* et *Dasylinum*, et l'autre à fleurs jaunes contenant les sections *Linopsis* et *Syllinum*, ainsi que *Cathartolinum*. Toutes les sections étaient monophylétiques sauf *Linopsis* (McDill et al., 2009 ; McDill & Simpson, 2011).

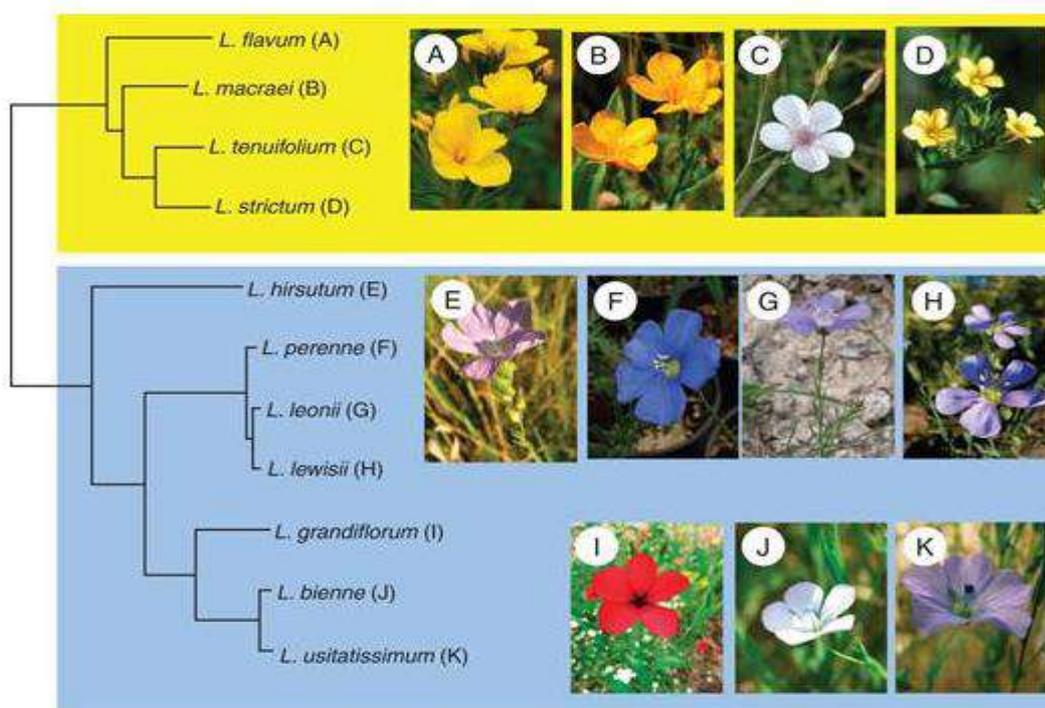


Figure 2. Phylogénie STAR des 11 espèces de *Linum* construit à partir de 413 arbres génétiques (Sveinsson et al., 2014).

Classification du genre *Linum* selon Global Biodiversity Information Facility (GBIF)

Règne	→	Plantae
Embranchement	→	Spermatophytes
Classe	→	Magnoliopsida
Sous-classe	→	Rosidae
Ordre	→	Linales
Famille	→	Linacées
Genre	→	<i>Linum</i>

I.2.4 *Linum trigynum* L.

L. trigynum est une plante herbacée ; annuelle ; à tige glabre de 8 à 40 cm, grêle, ramifiée, dressée, arrondie; feuilles glabres, de 3-14 x 0,4-1,5 mm, à une nervure, simples, alternes, linéaires–lancéolées, sessiles, à bord dentelé et un peu rude, quelque peu involutées; fleurs de 18-25 mm, inflorescences corymbiformes, lâches, actinomorphes, hermaphrodites, homostyles; à 5 sépales, de 3-4 mm, libres, ovales-lancéolés, brièvement acuminés, à bord cilié–glandulaire; 5 pétales, plus longs que les sépales, de 4,5-6 mm, libres, spatulés, jaunes; floraison en juin-juillet; petite capsule de 1,5-2,4 mm, sphérique, apiculée, s'ouvrant par 10 valves; graines de 0,7-1 mm (Figure 3) (López et al., 2011; Quézel & Santa,1962).



Figure 3. Photos de la plante *Linum trigynum* L. [R2]

Selon The Plant List (23 mars 2012) les noms *Cathartolinum gallicum* (L.) Rchb., *Chrysolinum gallicum* (L.) Fourr., *Linum aureum* Waldst. & Kit., *Linum gallicum* L. sont considérés comme des synonymes [R3].

I.2.5 *Linum numidicum* Murb.

Linum numidicum endémique d'Afrique du Nord, observée en Numidie, en Kabylie et dans les montagnes du Maroc (Medjahdi et al., 2018).

Linum numidicum est une plante vivace, à tige dressées ou ascendantes à la base, 20 à 80 cm, très élancées, densément feuillée, ligneuses, striées et ramifiée en corymbe dans la partie supérieure; feuilles, glabres, alterne, scabres, trinerviées à marge dentée; fleurs de 15-20 mm à pétales long 2-3 fois plus longs que les sépales, obliques; sépales largement lancéolés ou lancé-ovales, égalant ou dépassant à peine la capsule, les intérieurs brusquement et courtement acuminés; pétales longs de 18 à 24 mm; floraison en juin-juillet; capsule subpyramidale-sphérique, plus haute que le diamètre transversal (4,5-5 mm x 3-4 mm), ses valves épaisses, se séparant tardivement et pas jusqu'à la base; graines oblongues, brun foncé, 2-2.1 mm de longueur, 1-2 mm de largeur (Figure 4) (Murbeck, 1905; Quézel & Santa, 1962).



Figure 4. Photos de la plante *Linum numidicum* Murb.[R4]

I.3 Métabolites secondaires et activités biologiques du genre *Linum* (extraits des parties aériennes et racinaires)

Les espèces de genre *Linum* sont connues pour avoir une activité anticancéreuse (Hartwell, 1982). Plusieurs études ont documenté que les espèces de *Linum* et leurs composés inhibent la croissance de diverses cellules cancéreuses par l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Tableau 1).

Tableau 1. Quelques activités biologiques reconnues du genre *Linum*

Espèces	Activités	Références
<i>L. usitatissimum</i>	Analgésique et anti-inflammatoire	Rafieian-Kopaei et al., 2017
	Effets anticancérogènes sur les lignées de cancer du sein (MCF-7 et BT20)	Theil et al., 2013
	Activité antitumorale contre la lignée MCF7	Enge et al., 2015
<i>L. persicum</i>	Induction de la apoptose dans les cellules leucémiques (K562 et Jurkat)	Amirghofran et al., 2006
	Activité cytotoxique	Javidnia et al., 2005
<i>L. grandiflorum</i>	Activité cytotoxique contre la lignée cellulaire EL4	Mohammed et al., 2010
<i>L. album</i>	Activité antitumorale et cytotoxique	Weiss et al., 1975
	Induction de l'apoptose	Asl et al., 2018
<i>L. flavum</i>	Activité cytotoxique	Berlin et al., 1988
<i>L. tauricum</i> Willd	Activité cytotoxique	Vasilev et al., 2005
<i>L. narbonense</i>	Activité cytotoxique	Vasilev & Ionkova, 2005

<i>L. leonii</i>	Activité cytotoxique	Vasilev & Ionkova, 2005
<i>L. lineraifolium</i>	Effet antiprolifératif	Ionkova et al., 2010

I.4 Etudes chimiques antérieures sur le genre *Linum*

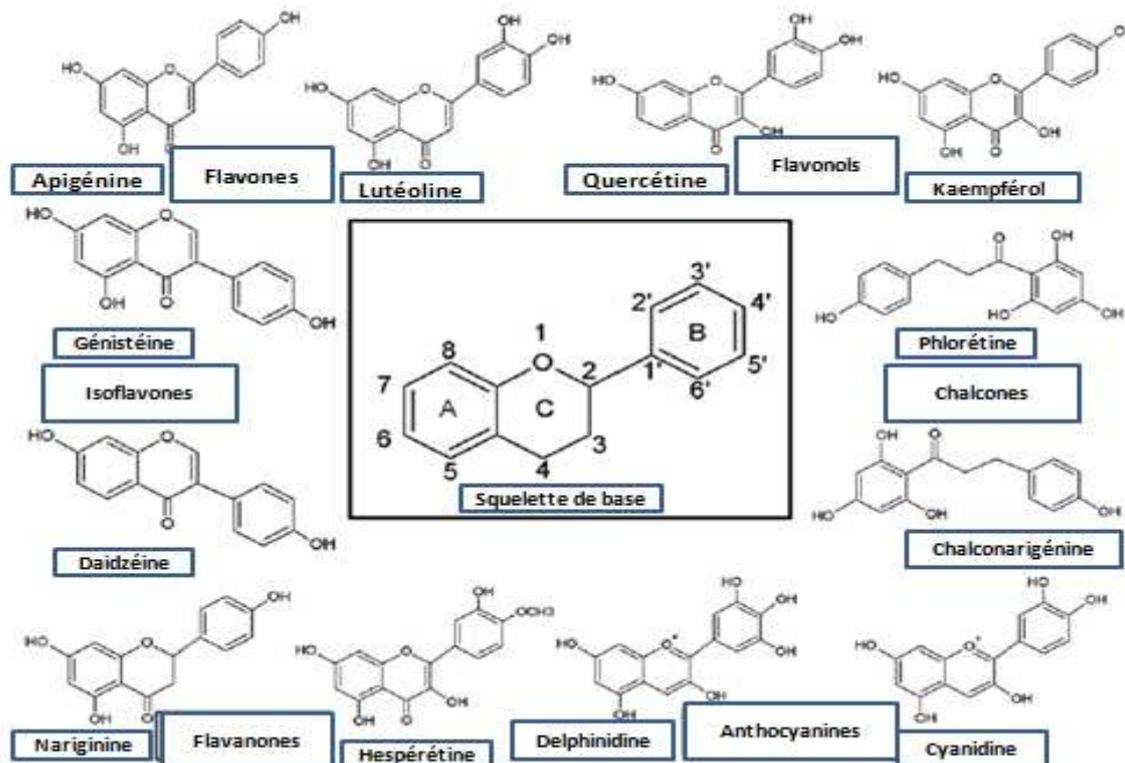
Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces de genre *Linum* montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques de puis 1971. Celles ci ont permet d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes appartiennent au groupe des composés polyphénoliques et plus précisément aux classes des flavonoïdes et lignanes.

I.4.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe importante de produits naturels, ils appartiennent à une classe de métabolites secondaires de plantes ayant une structure polyphénolique, largement présent dans les fruits, les légumes et certaines boissons.

Ils ont divers effets biochimiques et antioxydants favorables associés à diverses maladies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, etc. (Burak & Imen ,1999; Panche et al., 2016).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en différents sous-groupes en fonction du carbone du cycle C auquel le cycle B est attaché et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C (Figure 5).



Figures 5. Structure du squelette de base des flavonoïdes et leurs classes

(Panche et al., 2016).

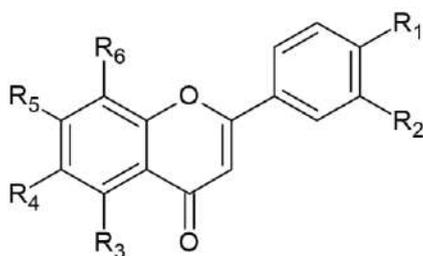
Le tableau 2 et la figure 6 résument les différents flavonoïdes isolés à partir de plusieurs espèces du genre *Linum*.

Tableau 2. Distribution des flavonoïdes dans le genre *Linum*

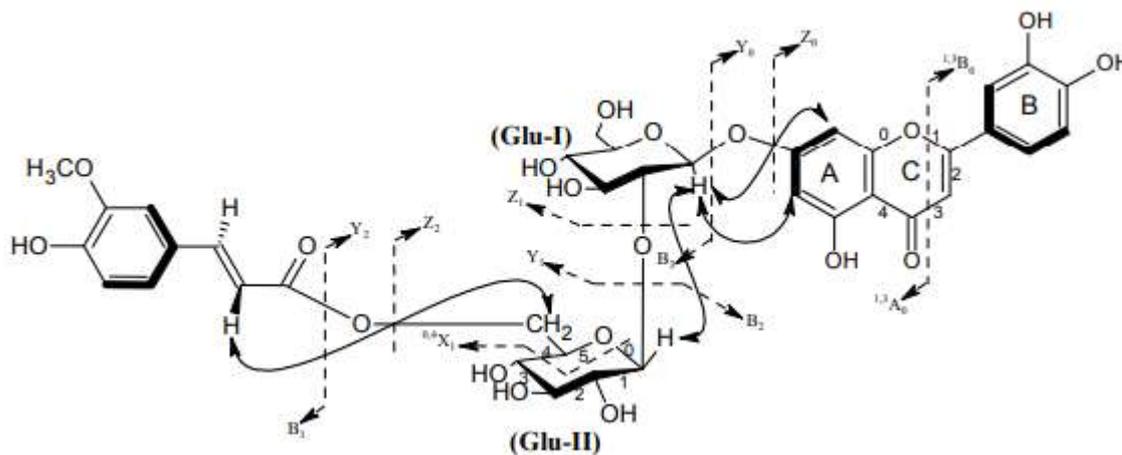
Flavonoïdes [N° de structure]	Espèces	Références
Vicenine-1 [1]	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	Mohammed et al., 2009
Vicenine-2 [2]	<i>L. usitatissimum</i>	Dubois & Mabry, 1971
Vicenine-3 [3]	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	Mohammed et al., 2009
Orientine [4]	<i>L. usitatissimum</i>	Dubois & Mabry, 1971
Iso-orientine [5]	<i>L. capitatum</i>	Stosic et al., 1989

	<i>L. usitatissimum</i>	Dubois & Mabry, 1971
Vitexine [6]	<i>L. usitatissimum</i>	Dubois & Mabry, 1971
Iso-vitexine [7]		
Lucénine-1 [8]		
7-Rhamnosyl-lucénine-2 [9]		
3', 4'-dimethoxy7-rhamnosyl-lutéoline [10]	<i>L. maritimum</i>	Volk & Sinn, 1968; Wagner et al., 1972
Linocide A [11]		
Linocide B [12]		
Genkwanine-4'-O-β- D-glucopyranoside [13]	<i>L. usitatissimum</i>	Sun et al., 2009
6-C-[β- D-glucuronopyranosyl (1→6)-O-β- D-glucuronopyranoside] apigénine (Mucronatoside 1) [14]	<i>L. mucronatum</i> subsp. <i>orientale</i>	Zare et al., 2014
7-O-methyl[-4'-O-β- D-arabinofuranosyl (1→6)-O-β- D-glucuronopyranoside] apigénine (Mucronatoside 2) [15]		
Lutéoline-7-O-α- D-(6'''-Eferuloyl) glucopyranosyl(1→2)-β- D-glucopyranoside (glucolutéoline) [16]	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	Mohammed et al., 2009

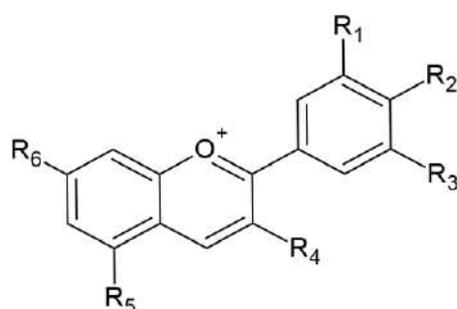
<p>3-Glucorutinosyl pélargonidine [17] 3-Glucorutinosyl cyanidine [18] 3-Glucorutinosyl délfphinidine [19] 3-tri-Glucosyl pélargonidine [20] 3-tri-Glucosyl cyanidine [21] 3-tri-Glucosyl délfphinidine [22] 3-di-Glucosyl délfphinidine [23] 3-rutinosyl pélargonidine [24] 3-rutinosyl cyanidine [25] 3-rutinosyl délfphinidine [26] 3-Glucosyl pélargonidine [27] 3-Glucosyl cyanidine [28] 3-Glucosyl délfphinidine [29] 3-xylorutinosyl délfphinidine [30]</p>	<p><i>L. usitatissimum</i></p>	<p>Muir & Westcott, 2003</p>
--	--------------------------------	----------------------------------



- [1] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-xyl, R₅ = OH, R₆ = C-glc
 [2] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-glc, R₅ = OH, R₆ = C-glc
 [3] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-glc, R₅ = OH, R₆ = C-xyl
 [4] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = OH, R₆ = C-glc
 [5] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-glu, R₅ = OH, R₆ = H
 [6] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = OH, R₆ = C-glc
 [7] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-glc, R₅ = OH, R₆ = H
 [8] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-xyl, R₅ = OH, R₆ = C-glc
 [9] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = C-glu, R₅ = O-rham, R₆ = C-glu
 [10] R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = O-rham, R₆ = H
 [11] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = OH, R₆ = C-glc-2''rham-6''-Ac
 [12] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = OH, R₆ = C-glc-2''rham
 [13] R₁ = O-glc, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = O-CH₃, R₆ = H.
 [14] R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = C-β-D-glucuronopyranosyl (1→6)-O-β-D-glucuronopyranoside, R₅ = OH, R₆ = H.
 [15] R₁ = O-β-Darabinofuranosyl (1→6)-O-β-D-glucuronopyranoside, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = H, R₅ = 7-Omethyl, R₆ = H.



[16]



[17] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-glc-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

[18] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-glc-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

[19] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = O-glc-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

[20] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-tri-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[21] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-tri-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[22] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = O-tri-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[23] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = O-di-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[24] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

[25] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

[26] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = O-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

[27] R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[28] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = O-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[29] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = O-glc, R₅ = OH, R₆ = OH

[30] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = O-xyl-rut, R₅ = OH, R₆ = OH

Figure 6. Structures des flavonoïdes isolés du genre *Linum*

I.4.2 Les lignanes

Les lignanes sont des métabolites secondaires, produits dans presque toutes les parties de la plante, y compris les racines, feuilles, fleurs, fruits, tiges et graines. Ils occupent une zone assez grande dans le monde végétal. Ils ont été identifiés dans près de 70 familles, dont beaucoup ont été utilisées dans la médecine traditionnelle. Les travaux de recherche phytochimique et pharmacologique de nouveaux lignanes ont fait des progrès remarquables, un total de 354 nouveaux lignanes naturels ont été isolés à partir de 61 familles de plantes et identifiés entre 2005 et 2011 (Zhang et al., 2014).

Les dimères de phénylpropanoïdes C6-C3 (Figure 7), sont appelés lignanes lorsque les unités phénylpropanes sont liées par C8-C8' du groupement propane (Haworth, 1936) et néolignanes lorsque les deux phénylpropanes sont liés autrement que par une liaison C8-C8' (Gottlieb, 1972).

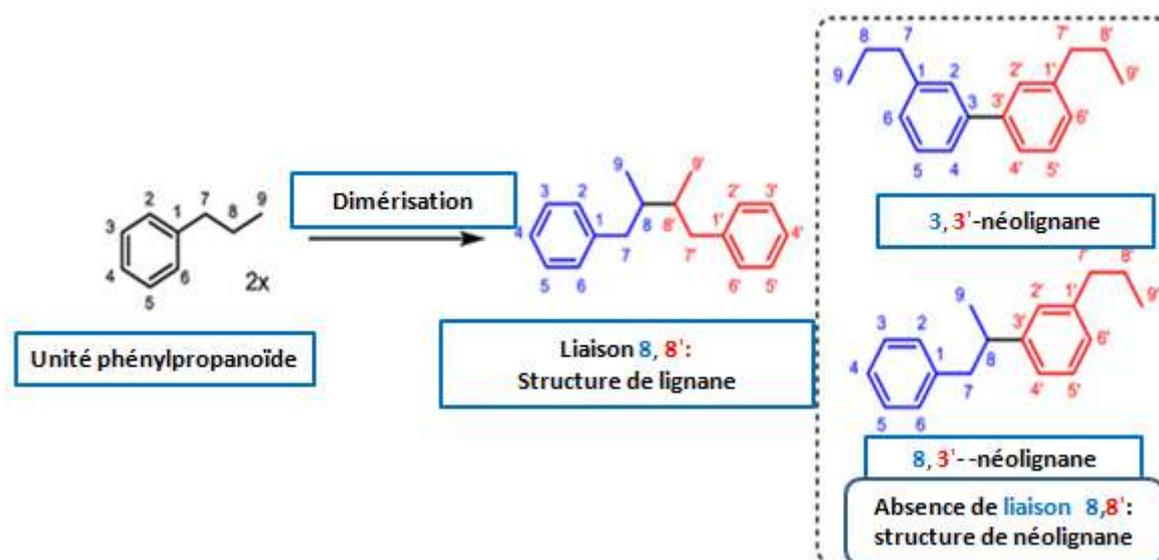
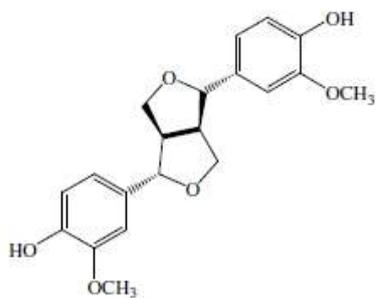


Figure 7. Dimérisation des phénylpropanoïdes - lignane et néolignane (Zálešák et al., 2019).

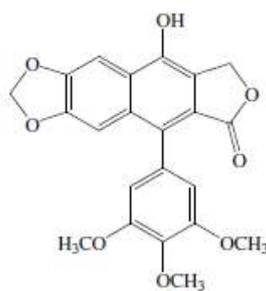
Selon le mode d'incorporation de l'atome d'oxygène et le type de cyclisation, les lignanes sont classés en huit groupes structuraux (Figure8) (Umezawa, 2003).

1. Les furanofuranes



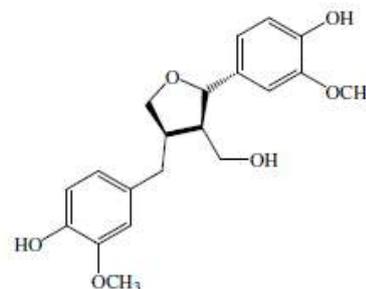
Pinorésinol

2. Les aryltétralines



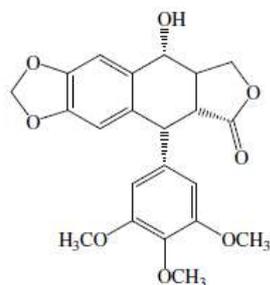
Podophyllotoxine

3. Les furanes



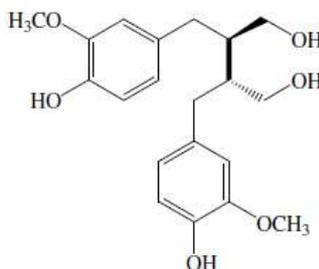
Larisirésinol

4. Les arylnaphtalènes



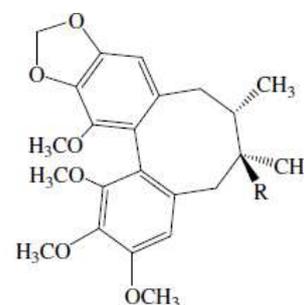
Déhydropodophyllotoxine

5. Les dibenzylbutanes



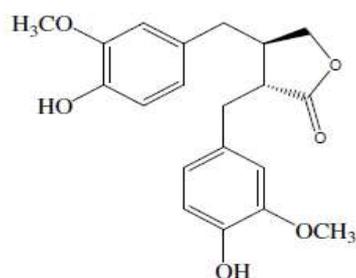
Sécoisolarisirésinol

6. Les dibenzocyclooctadiènes



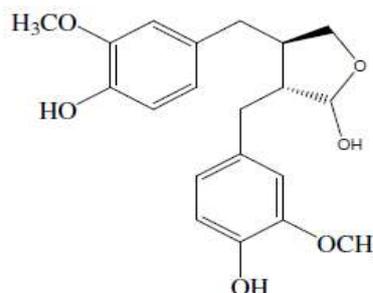
Gimisine

7. Les dibenzylbutyrolactones



Matairésinol

8. Les dibenzylbutyrolactols



Lactol

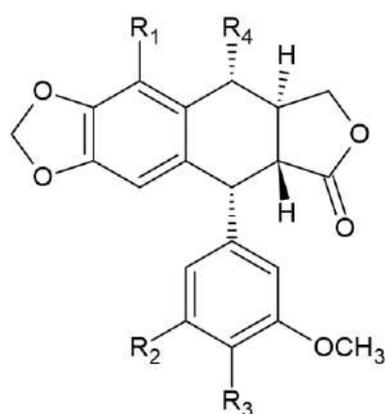
Figure 8. Les groupes structuraux de lignanes (Umezawa, 2003).

Les différents lignanes qui sont isolés de plusieurs espèces du genre *Linum* sont rassemblés dans les tableaux 3,4, et 5.

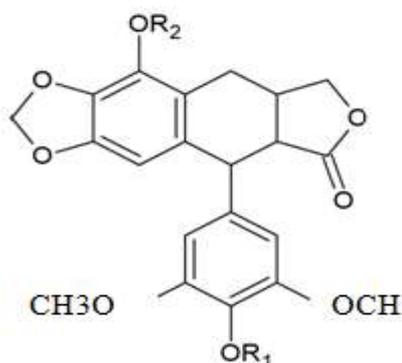
Tableau 3. Distribution des lignanes aryltétralines dans le genre *Linum*

Lignanes aryltétralines [N° de structure]	Espèces	Références
Podophyllotoxine [31] (PTOX)	<i>L. album</i>	Javadian et al., 2017; Smolny et al., 1992
	<i>L. thracicum</i>	Sasheva et al., 2013
	<i>L. persicum</i>	Mohagheghzadeh et al., 2003
	<i>L. mucrona</i> ssp. <i>Armenum</i> (Bordz.) Davis	Konuklugil et al., 2001
	<i>L. nodiflorum</i>	Konuklugil et al. 1999
	<i>L. mucronatum</i> subsp. <i>orientale</i>	Zare et al., 2014
	<i>L. linearifolium</i>	Ionkova, 2008
6-Méthoxypodophyllotoxine [32] (6MPTOX)	<i>L. mucronatum</i> ssp. <i>armenum</i>	Konuklugil et al., 2001; Ionkova, 2007
	<i>L. flavum</i>	Ionkova, 2007; Vasilev et al., 2008
	<i>L. capitatum</i>	
	<i>L. arboretum</i>	
	<i>L. campanulatum</i>	
	<i>L. elegans</i>	
	<i>L. pamphylicum</i>	
	<i>L. tauricum</i>	
	<i>L. thracicum</i>	
	<i>L. sibiricum</i>	
	<i>L. nodiflorum</i>	
	<i>L. scabrellum</i>	Alejandre-García et al., 2015
	<i>L. album</i>	Mohagheghzadeh et al., 2006
<i>L. cariense</i>	Konuklugil et al., 2007	
5-Méthoxypodophyllotoxine [33] (5-MPT)	<i>Linum grandiflorum</i> Desf.	Mohammed et al., 2009
	<i>L. flavum</i>	Oostdam & van der Plas, 1993
	<i>L. persicum</i>	Javidnia et al., 2005
5-Méthoxypodophyllotoxine acétate [34]	<i>L. persicum</i>	Javidnia et al. 2005
5'-Déméthoxy-6- méthoxypodophyllotoxine [35]	<i>L. cariense</i>	Konuklugil et al., 2007
	<i>L. flavum</i>	Wichers et al., 1990, 1991
4'-Déméthyl-6- méthoxypodophyllotoxine [36]	<i>L. tauricum</i>	Ionkova & Fuss, 2009
	<i>L. cariense</i>	Konuklugil et al., 2007

3'-Déméthylpodophyllotoxine [37]	<i>L. album</i>	Weiss et al., 1975
Déoxypodophyllotoxine [38] (DPTOX)	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	Mohammed et al., 2009
	<i>L. album</i>	Smollny et al., 1998
	<i>L. nodiflorum</i>	Konuklugil et al., 1999
α -peltatine [39] β -Peltatine [40]	<i>L. album</i>	Smollny et al., 1998
	<i>L. persicum</i>	Mohagheghzadeh et al., 2003
6-MeO- α - peltatine [41]	<i>L. mucronatum</i> subsp. <i>orientale</i>	Konuklugil, 2005



- [31] R₁= H, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃, R₄= OH
 [32] R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃, R₄= OH
 [33] R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃, R₄= OH
 [34] R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃, R₄= OAC
 [35] R₁= OCH₃, R₂= H, R₃= OCH₃, R₄= OH
 [36] R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OH, R₄= OH
 [37] R₁= H, R₂= OH, R₃= OCH₃, R₄= OH
 [38] R₁=R₂=H, R₃= OCH₃, R₄= OH

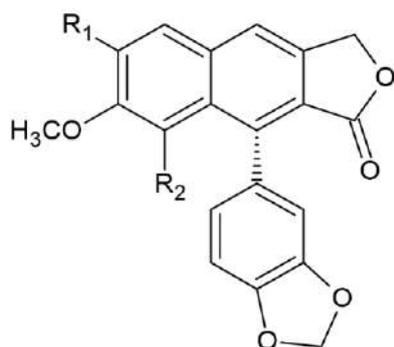


- [39] R₁= R₂ = H
 [40] R₁= CH₃, R₂ = H
 [41] R₁= CH₃, R₂ = H

Figure 9. Structure des lignanes aryltétralines isolés du genre *Linum*

Tableau 4. Distribution des lignanes arylnaphthalènes dans le genre *Linum*

Lignanes arylnaphthalènes [N° de structure]	Espèces	Références
Justicidine B [42]	<i>L. perenne</i>	Schmidt et al., 2007; Hemmati et al., 2007
	<i>L. leonii</i>	Vasilev & Ionkova, 2005
	<i>L. narbonense</i>	
	<i>L. altaicum</i>	Konuklugil et al., 2007
	<i>L. lewisii</i>	
	<i>L. austriacum</i> ssp. <i>euxinum</i>	
	<i>L. austriacum</i>	Mohagheghzadeh et al., 2002
<i>L. campanulatum</i>	Vasilev et al., 2004; Vasilev & Ionkova, 2005	
Isojusticidine B [43]	<i>L. perenne</i>	Schmidt et al., 2007; Hemmati et al., 2007
	<i>L. leonii</i>	Vasilev & Ionkova, 2005
	<i>L. altaicum</i>	Vasilev & Ionkova, 2005
	<i>L. lewisii</i>	
	<i>L. austriacum</i> ssp. <i>euxinum</i>	
	<i>L. austriacum</i>	Mohagheghzadeh et al., 2002



[42] R₁ = OCH₃, R₂ = H

[43] R₁ = H, R₂ = OCH₃

Figure 10. Structure des lignanes arylnaphthalènes isolés du genre *Linum*

Tableau 5. Distribution des lignanes aryldihydronaphthalènes dans le genre *Linum*

Aryldihydronaphthalènes [N° de structure]	Espèces	Références
Linoxépine [44]	<i>L. perenne</i>	Schmidt et al., 2007
7,8-dihydroisojusticidine B [45]		
7,8-dihydrorétrohélioxanthine [46]		
7,8-dihydrotaiwanine C [47]		

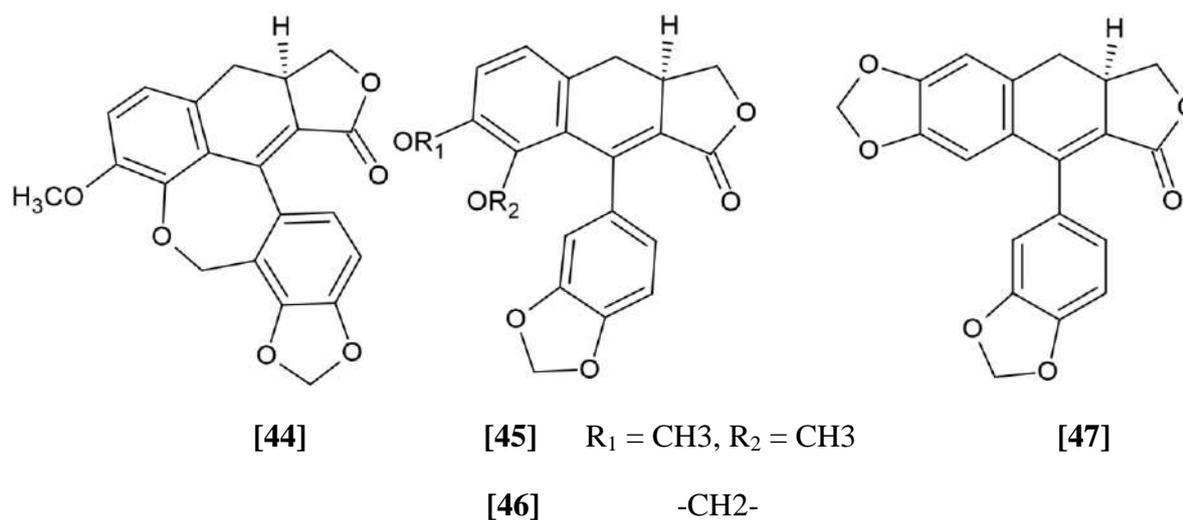


Figure 11. Structure des lignanes aryldihydronaphthalènes isolés du genre *Linum*.

I.4.3 Autres composés

D'autres composés ont été également signalés comme étant présent dans les espèces de *Linum* comme les glycosides cyanogènes (Hegnauer, 1966; Hegnauer, 1989), les alcènes (Zare et al., 2014), les terpenoïdes et les maléimides (Sun et al., 2009).

Chapitre II. Activités antioxydante et anticholinestérase

II.1. Les antioxydants

Le concept d'antioxydant fait référence à tout composé capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation d'un substrat à une concentration plus faible que celle du substrat oxydable (Naito et al., 2014; Zhao et al., 2019).

Les antioxydants sont des composés chimiques qui peuvent donner leurs électrons à d'autres molécules, telles que les espèces réactives d'oxygène (ROS) pour les convertir en molécules plus stables, telles que H₂O et O₂, les empêchant ainsi de prendre des électrons d'autres molécules biologiquement importantes, telles que les protéines ou l'ADN, elles sont donc appelées piègeurs de ROS (Dunnill et al., 2017; Pisoschi & Pop, 2015).

Les fonctions antioxydantes impliquent la diminution du stress oxydatif, des mutations de l'ADN, des transformations malignes, ainsi que d'autres paramètres des dommages cellulaires (Comino-Sanz et al., 2021).

L'homéostasie redox de la cellule est assurée par son système complexe de défense antioxydants endogènes et exogènes, les antioxydants endogènes comprennent des enzymes antioxydantes endogènes telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, et la thiorédoxine-1 et -2, et des composés non enzymatiques comme les protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine), le glutathion, et des piègeurs de faible poids moléculaire, comme l'acide urique, coenzyme Q et acide lipoïque (Poljsak et al., 2013).

Les antioxydants exogènes présents dans les fruits et légumes contrebalancent l'activité des antioxydants endogènes.

Les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques: stilbènes, acides phénoliques tels que benzoïque et les acides hydroxybenzoïques, les dérivés des acides cinnamique et hydroxycinnamique, et les flavonoïdes (flavonols, flavanes, flavanones, flavanols, flavones, et les anthocyanidines), sont actuellement considérés comme les principaux antioxydants exogènes (Pisoschi & Pop, 2015).

Les antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) et le gallate de propyle (PG) sont les plus couramment utilisés dans les applications alimentaires et pharmacologiques (Hudson, 1990).

Plusieurs méthodes *in vitro* et *in vivo* sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante. Les plus couramment utilisées *in Vitro* sont: les méthodes de piégeage des radicaux DPPH•, test ABTS•+, réduction cuprique (CUPRAC), et chélation des ions ferreux.

II.2 Les cholinestérases

Les cholinestérases (ChE), l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), sont des enzymes sérine hydrolases, responsables de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh), agissent en interrompant son action aux jonctions des différentes terminaisons nerveuses cholinergiques avec leurs organes effecteurs respectifs ou sites post-synaptiques. L'inactivation immédiate de l'ACh est nécessaire pour empêcher la diffusion latérale et l'activation séquentielle des récepteurs. Cependant, une forte baisse des niveaux de ce neurotransmetteur entraîne une diminution des fonctions cérébrales et, par conséquent, une perte progressive des capacités intellectuelles.

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (galantamine, rivastigmine et donépézil) sont les premier choix pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA), mais ils présentent certains inconvénients, tels qu'une limitation de la dose et un effet thérapeutique à long terme insatisfaisant. Ils agissent en interférant avec la fonction hydrolytique des ChE pour augmenter les niveaux d'ACh dans les synapses et l'excitabilité centrale, améliorant ainsi les troubles cognitifs et traitant la MA (Hosseini et al., 2022; Zhou & Huang, 2022).

Dans le tissu cérébral des patients atteints de MA, l'AChE est plus abondante que la BChE, ce qui contribue à la dégradation de l'ACh dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Nordberg et al., 2013).

La BChE est synthétisée dans le foie et on la trouve principalement dans le plasma, elle se caractérise par une affinité plus faible pour l'ACh par rapport à l'AChE, mais elle joue un rôle crucial dans le processus d'hydrolyse de l'ACh avec la baisse des niveaux d'AChE dans les derniers stades de la MA en tant qu'enzyme compensatrice.

Diverses études ont suggéré que l'inhibition des cholinestérases est une stratégie potentielle pour le traitement de la MA avancée (Gholivand et al., 2010 ; De Andrade et al., 2019).

Chapitre III. Biologie du cancer

III.1 Cancer

III.1.1 Données épidémiologiques

Le cancer est la principale cause de mortalité dans le monde avec près de 10 million de décès en 2020, principalement dus aux cancers du poumon, colorectal, du foie, de l'estomac et du sein (Figure 12). Les cancers les plus fréquents en termes de nombre de cas recensés sont les cancers du sein, du poumon, colorectal, et de la prostate (Figure 13) (GLOBOCAN 2020, IARC).

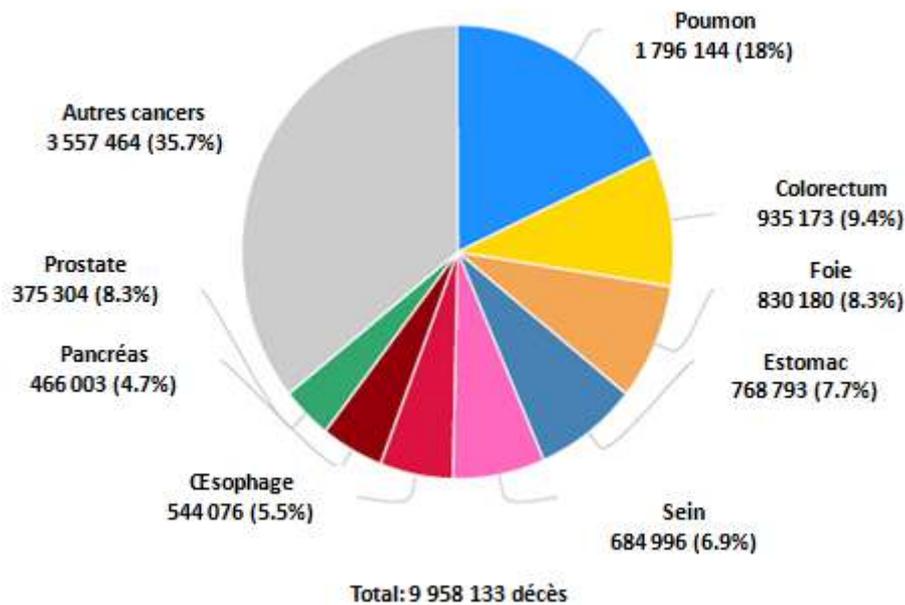


Figure 12. Nombre de décès en 2020, les deux sexes, tous âges (GLOBOCAN 2020, IARC).

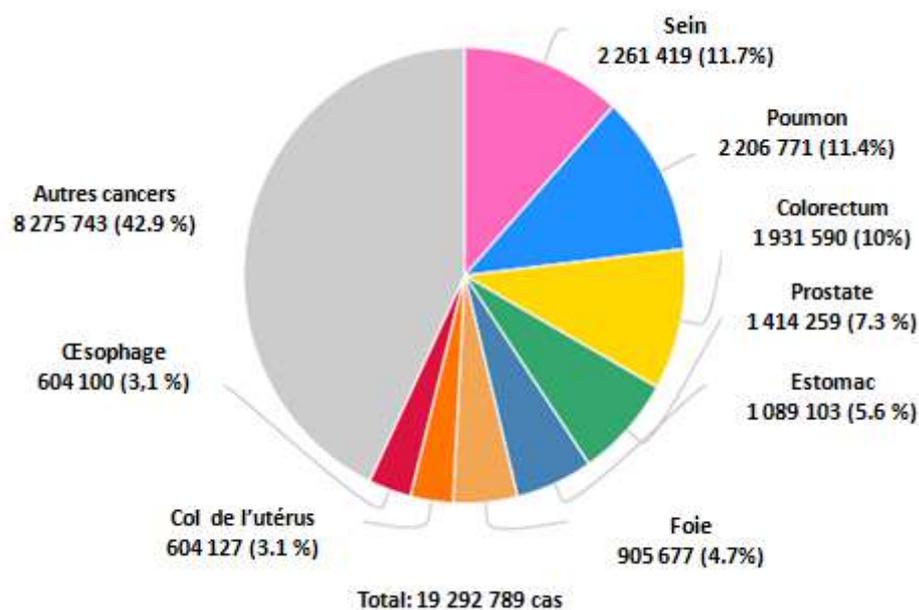


Figure 13. Nombre de nouveaux cas en 2020, les deux sexes, tous âges (GLOBOCAN 2020, IARC).

En Algérie, l'incidence du cancer est en nette augmentation, 58418 nouveau cas (31 090 femmes et 27 328 hommes) et 32802 décès (14 900 femmes et 17 902 hommes) ont été recensés en 2020, principalement dus aux cancers du sein, du poumon, de la prostate, du colon et au cancer de la vessie (GLOBOCAN 2020, IARC).

III.1.2 Caractéristiques du cancer

Le cancer est une pathologie caractérisée par l'acquisition de plusieurs capacités biologiques, ces caractéristiques comprennent le maintien de la signalisation proliférative, l'échappement aux signaux suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, le potentiel répliatif illimité, la promotion de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion et des métastases, l'instabilité génomique et l'acquisition de mutations, la capacité à échapper au système immunitaire et la promotion de l'inflammation, et en fin la dérégulation des voies métaboliques (Hanahan & Weinberg, 2011).

De plus, Hanahan (2022) a incorporé d'autres caractéristiques émergentes proposées et des caractéristiques habilitantes impliquant le "déverrouillage de la plasticité phénotypique", la "reprogrammation épigénétique non mutationnelle", les "microbiomes polymorphes", et les "cellules sénescentes" (Figure 14).

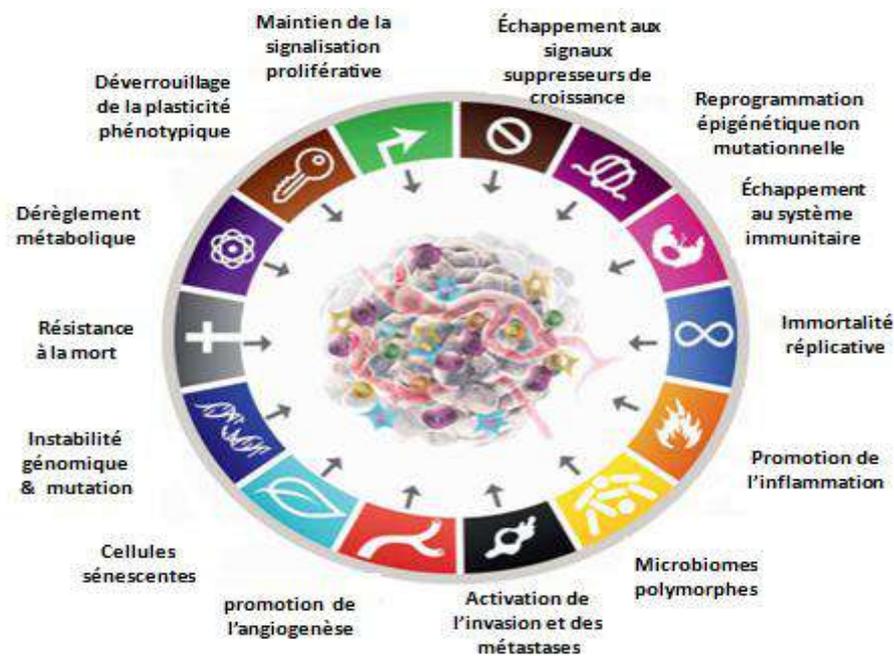


Figure 14. Les caractéristiques biologiques du cancer (Hanahan, 2022).

III.1.3 Processus de cancérogenèse

Le processus de cancérogenèse peut être divisé en différentes étapes étroitement liées : l'initiation, la promotion, la progression et métastase, dans lesquelles se produisent des altérations moléculaires et cellulaires distinctes (Figure 15).

L'initiation de la formation de tumeurs implique l'altération, le changement ou la mutation de gènes qui apparaissent spontanément ou après exposition aux substances cancérogènes qui seront activées par des voies métaboliques, une fois activées, elles augmentent les ROS ce qui conduit à l'initiation de la tumeur en endommageant l'ADN.

Les altérations génétiques peuvent déréguler les voies de signalisations impliquées dans la survie, la prolifération, et la différenciation cellulaire qui peuvent être notamment influencées par le type et le taux de substance cancérogène et par la réponse de réparation de l'ADN.

L'étape de promotion est un processus relativement long dans lequel les cellules initiées commencent une prolifération active conduisant à l'accumulation des cellules pré-néoplasiques. Les agents chimiopréventifs peuvent altérer ce dernier et affecter le taux de croissance.

La phase d'initiation et promotion sont réversibles et peuvent être inversées par les activités métaboliques.

La phase de progression est la phase entre une lésion précancéreuse et le développement d'un cancer invasif, un processus irréversible, où se produit la prolifération cellulaire avec des changements phénotypiques et génétiques, cela implique une augmentation rapide de la taille de la tumeur où les cellules peuvent subir d'autres mutations avec un potentiel invasif et métastatique.

Les métastases se forment à la fin du processus de cancérogénèse, la capacité à former des métastases est la dernière caractéristique acquise du cancer. Les altérations génétiques accumulées favorisent l'apparition des tumeurs secondaires. Les agents chimiopréventifs sont connus pour inhiber l'angiogenèse et l'invasion des tumeurs primaires, et pourraient donc être utilisés pour inhiber la métastase du cancer (Sharma et al., 2018; Siddiqui et al., 2015).

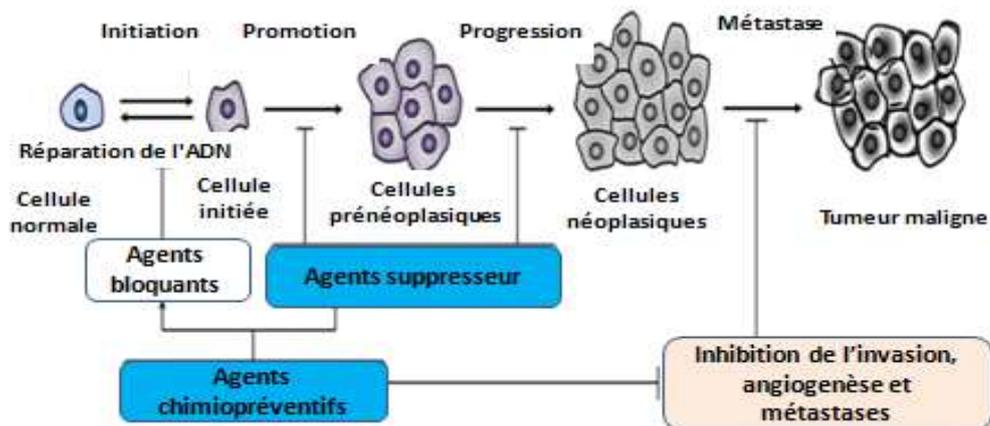


Figure 15. Phases de cancérogénèse : initiation, promotion, progression et métastase (Siddiqui et al., 2015).

III.2 Cycle cellulaire

La prolifération des cellules cancéreuses est principalement contrôlée par le cycle cellulaire, et le dérèglement du cycle cellulaire est une caractéristique fondamentale de cancers (Otto & Sicinski, 2017; Vermeulen et al., 2003).

Le cycle cellulaire est un processus crucial pour la croissance et essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire, ayant lieu entre deux divisions cellulaires successives et qui suit une série d'évènement moléculaire finement régulée. Le cycle cellulaire chez les eucaryotes se compose de quatre phases distinctes : G1, S, G2, et M et un état de quiescence appelé phase G0, les phases (G1, S et G2) constituent l'interphase tandis que, la phase M la mitose. (Dalton, 2015; Howard & Pelc, 1953)

La phase G1, phase pré-synthétique ou phase de croissance, commence immédiatement après la phase M, où de nouveaux organites se forment avec la synthèse des protéines et de l'acide ribonucléique (ARN). À la fin de la phase G1, la cellule atteint le double de sa taille initiale.

Ceci est suivi par la phase S, phase synthétique dans laquelle, l'ADN commence à se dupliquer et une copie de chaque chromosome est formée, ainsi que la synthèse d'ARN et de protéines.

Dans la phase G2, phase prémitotique, la cellule se prépare à commencer la mitose, où la synthèse d'ADN s'arrête, mais la synthèse d'ARN et de protéines se poursuit.

La mitose (phase M) se compose classiquement de 5 étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, et télophase. Elle comprend deux évènements, la division des noyaux (cytodiérèse) permettant le partage équitable de l'information génétique, et la division du cytoplasme (cytokinèse) des cellules mères en deux cellules filles (Maller, 1990; Masui, 2001).

L'activation de chaque phase du cycle cellulaire dépend de la bonne progression et de l'achèvement de la précédente.

Il s'agit d'une chaîne de processus avant la division d'une cellule mère en deux cellules filles (Barnum & O'Connell, 2014; Gordon et al., 2018; Schwartz & Shah, 2005).

III.2.1 Régulation du cycle cellulaire

III.2.1.1 Les complexes cyclines/CDK

La progression d'une phase à l'autre est régulée par les CDK (Boweret al., 2017) qui sont des kinases cycline dépendantes appartiennent à un groupe de protéines kinases spécifiques de la thréonine. Leur activation est dépendante de la disponibilité des cyclines (Ding et al., 2020).

Les CDK régulent la prolifération cellulaire via la régulation de points de contrôle distincts du cycle cellulaire (Figure 16) (Bai et al., 2017; Bury et al., 2021).

Les kinases interphasiques dépendantes de la cycline, CDK4 et CDK6, contrôlent l'entrée du cycle cellulaire et la progression de la phase G1 (Arellano et Moreno, 1997). En formant un complexe CDK4/6-Cycline D (D1, D2, D3), CDK4 et CDK6 seront activés, ce qui permet l'initiation de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN et la progression du cycle cellulaire (Bendris et al., 2015).

Le complexe Cycline E /CDK2 est important pour la transition G1/S (point de restriction) et son niveau d'expression commence à baisser lorsque le cycle cellulaire entre en phase S (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992). Le complexe cycline E/CDK2 et la cycline A/CDK2 sont nécessaires pour l'initiation de la réplication de l'ADN au cours de la phase S (Mombach et al. 2014).

La cycline A active CDK1 à la fin de la phase G2 pour faciliter l'apparition de la phase M, la cycline B/CDK1 est importante pour la transition G2/M elle peut phosphoryler plusieurs protéines nécessaires à la mitose et impliquées dans la rupture de la membrane nucléaire, la condensation des chromosomes, la fragmentation de l'appareil de Golgi, la formation du fuseau mitotique, et la fixation des chromosomes au fuseau (Swaffer et al. 2016; Meijer, 2003).

III.2.1.2 Les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (CKI_s)

Les CDK ne sont pas seulement contrôlés par la disponibilité des cyclines, mais elles sont régulées également par des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (CKI_s) qui se lient aux CDK libres ou aux complexes cyclines/CDK pour réguler négativement leur activité. Les CKI_s sont classés selon leur structure et leurs cibles en deux familles, la famille INK4 et la famille CIP/KIP (Figure 16).

Les membres de la famille INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, et p19^{INK4d}) ciblent spécifiquement CDK4 et CDK6. p16^{Ink4a} et p18^{INK4c} induisent l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en inhibant la capacité de CDK4/CDK6 de se lier avec la cycline D, inhibant ainsi indirectement la phosphorylation de la protéine Rb ce qui empêche la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S (Lee et al., 2015; Parry et al., 1995; Sánchez-Aguilera et al., 2004; Venkataramani et al., 2002; Viallard et al., 2001). La protéine p15^{Ink4b} induite par le TGF-β, bloque également le cycle cellulaire en phase G1 en se liant aux complexes cycline D-CDK4/6, de plus, les niveaux élevés de p15^{Ink4b} déplacent les protéines p27^{KIP1} liées des complexes cycline D-CDK4/6 aux complexes cycline E/CDK2, permettant ainsi l'arrêt de la prolifération cellulaire en phase G1 (García-Gutiérrez et al., 2019; Reynisdottir et al., 1995; Reynisdottir et al., 1997).

La Protéine p19^{INK4d} est un activateur indirect de la protéine p53, bloque le cycle cellulaire en phase G1 et G2, elle agit en atténuant la dégradation de p53 médiée par MDM2 (régulateur négatif de p53), en permettant la dégradation de MDM2, p19^{INK4d} stabilise la protéine p53 et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G1 et en G2 (Barbash & Diehl, 2015; Serrano et al., 1996; Sherr, 1998).

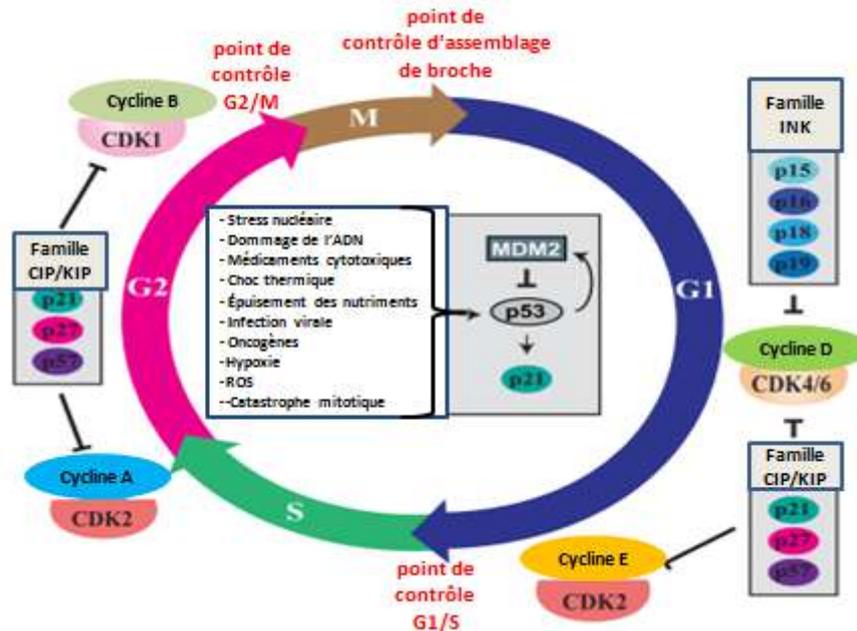


Figure 16. Régulation moléculaire du cycle cellulaire (Bury et al., 2021).

Les protéines Cip/Kip y compris p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} inhibent un large spectre de complexes cyclines/CDK (Figure 17), cycline E, A/CDK2 et/ou cycline B1,A/CDK1 et/ou

cycline D-CDK 4/6, mais dans certaines cas peuvent aussi stabiliser le complexe cycline D-CDK4/6. Ces fonctions divergentes peuvent être régulées à la fois par la quantité et le statut de phosphorylation des protéines Cip/Kip (Blain et al., 1997; Bury et al.,2021; Goel et al.,2018; Harper et al.,1993; Sherr & Roberts,1999).

Les protéines p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, sont des inhibiteurs à large spécificité des complexes cyclines/CDK, cycline (A,B,D, et E)/CDK (1,2,4, et 6) (Harper et al.,1993; Sgambato et al.,2000), se lient et inhibent l'activité des kinases, entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S et G2/M (Fojjer & Riele, 2006; Medemaa et al.,1998; Nakayama et al.,2004; Niculescu et al., 1998).

p57^{Kip2} est un puissant inhibiteur des complexes cycline/CDK en phases G1 et S (cycline E/CDK2, cycline D2/CDK4 et cycline A/CDK2) et dans une moindre mesure, de la cycline mitotique B/CDK1 (Lee et al., 1995).

Au cours de la phase G1 les complexes cycline D-CDK4/6 et la cycline E/CDK2 phosphorylent de manière coopérative les protéines de la famille RB, ce qui dissocie E2F1 du complexe pRb-E2F1 conduisant à l'activation de E2F1 qui induit l'expression des gènes essentielles à la réplication de l'ADN et à la progression du cycle cellulaire favorisant ainsi la transition G1/S (Buchkovich et al.,1989; Grinstein et al.,2006; Kent & Leone, 2019). Les CKIs jouent un rôle important dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, en inhibant les complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E/CDK2 par les membres de la famille INK et Cip/Kip respectivement, ce qui empêche la phosphorylation de la protéine Rb et favorise sa liaison à E2F1 ce qui inhibe la transcription des gènes ciblés par E2F1, déclenchant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1(Figure 17) (Cheng, 2004; Han et al.,2020; Narasimha et al., 2014).

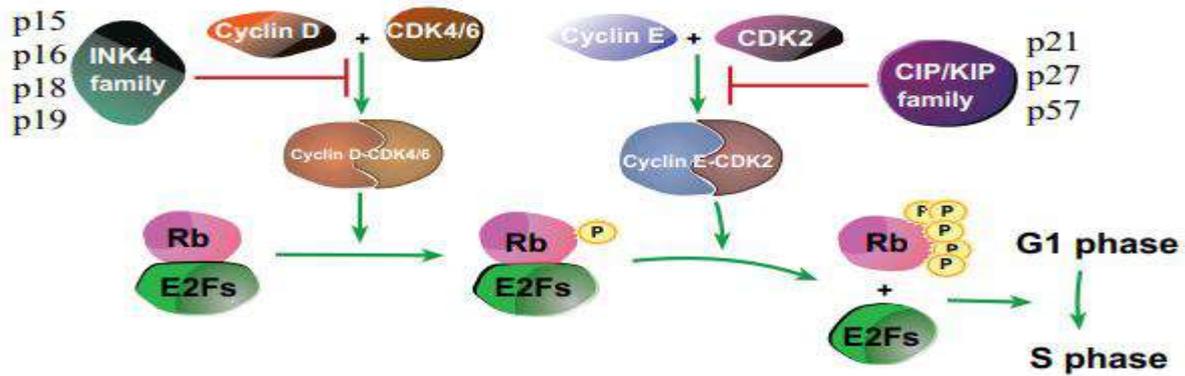


Figure 17. Régulation de la transition G1/S par les CKIs (Han et al., 2020).

III.2.2 Points de contrôle du cycle cellulaire

Les phases du cycle cellulaire sont réglementées par des points de contrôle (Checkpoints) : point de contrôle G1/S, également connu sous le nom point de restriction, le point de contrôle G2/M, le point de contrôle intra-S, et le point de contrôle du fuseau (transition métaphase-anaphase) (Novák et al., 2001; Visconti et al., 2016; Benedict et al., 2018; Yang, 2018), qui sont une composante essentielle de la machinerie de la surveillance cellulaire qui évite au mieux les défaillances et les déséquilibres éventuels du cycle cellulaire.

III.2.2.1 Point de contrôle G1/S

Le Point de contrôle G1/S également connu sous le nom de point de restriction, au cours de cette étape les cellules vérifient si l'environnement dispose suffisamment la matière première (bases nucléotidiques, ADN synthétase, facteurs de croissance etc.) pour favoriser la prolifération et si leur génome est prêt pour être répliqué. La cellule dont l'ADN est endommagé restera bloquée à ce point de contrôle.

Les protéines kinases de la famille ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related) activent différentes protéines dont sérine/thréonine kinases de point de contrôle, CHK1 (checkpoint kinase 1) et CHK2 (checkpoint kinase 2). Ces dernières régulant différents effecteurs du contrôle du cycle cellulaire, dont la phosphatase CDC25A (Smits & Gillespie, 2015; Sanchez et al, 1997), et la protéine p53 (Figure 18) (Chehab et al., 2000; van Jaarsveld et al., 2019).

La phosphatase CDC25A est la cible effectrice de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Après un stress génotoxique le complexe cycline E/CDK2 est inhibé par ubiquitinylation et dégradation de CDC25A par le protéasome, l'ubiquitinylation de CDC25A est médiée par sa phosphorylation par les kinases CHK1 et CHK2 activées par ATM/ATR, ce qui conduit au maintien de la phosphorylation inhibitrice sur Tyr 15 de CDK2 (CDK2 inactive) et donc empêche la transition des cellules de la phase G1 en phase S (Falck et al., 2001).

Lorsque les dommages ne sont pas réparés l'inhibition de la transition G1/S doit être maintenue par une deuxième voie tardive qui implique la phosphorylation de la protéine p53 et son ubiquitine ligase par les kinases ATM/ATR et CHK1/2. La phosphorylation de p53 par ATM/ATR empêche son association avec MDM2, un régulateur négatif de p53, ce qui entraîne une stabilisation de la protéine p53. La protéine p53 à son tour active la transcription de plusieurs gènes notamment p21^{CIP1}, cette dernière contribue au blocage G1/S en inhibant les fonctions de complexe cycline E/CDK2 entraînant une hypophosphorylation de pRb favorisant sa liaison à E2F1 ce qui inhibe la transcription des gènes ciblés par E2F1 essentielles à la réplication de l'ADN et à la progression du cycle cellulaire (Yang, 2018).

De plus, la dégradation rapide de la cycline D1 en réponse aux dommages à l'ADN se produit indépendamment de p53. La cycline D1 réduite diminue la quantité de complexes cycline D-CDK4/6, entraînant la redistribution de p21^{Cip1} aux complexes cyclines E/CDK2, entraînant l'inactivation de ces derniers. (Agami & Bernards, 2000; Sherr & Roberts, 1999).

III.2.2.2 Point de contrôle G2/M

Le point de contrôle G2/M empêche l'initiation de la mitose des cellules dont l'ADN est endommagé (ADN non réparé pendant la phase S ou G1), avant de subir la condensation chromosomique et la division nucléaire, les cellules doivent s'assurer qu'elles ont de cytoplasme et des phospholipides suffisants pour deux cellules filles et que leur ADN est entièrement répliqué et intact. La transition G2/M dépend de l'activité de complexe cycline B/CDK1 (Figure 18) (Yang, 2018).

Les médiateurs impliqués dans cette arrestation sont la voie ATM/ATR (Yan et al., 2016), la voie p38-MAPK induite par le stress (Astuti et al., 2009) et Wee1 (G2 Checkpoint kinase) (Vera et al., 2015).

Lors de dommages à l'ADN, les kinases CHK1/CHK2 phosphoryle la famille des phosphatases CDC25 ce qui crée un site de liaison pour les protéines 14-3-3 σ , cette interaction induit la séquestration cytoplasmique des phosphatases CDC25 ce qui maintient le complexe Cycline B/CDK1 sous sa forme inactive ce qui bloque la transition G2/M.

L'arrêt G2/M peut également être induit par la voie p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui inhibe CDC25B et CDC25C conduisant à son ubiquitination, ce qui empêche l'activation de complexe cycline B/CDK1, inhibant ainsi la transition G2/M (Wang et al., 2007). La kinase Wee1 maintient CDK1 dans un état inactif en phosphorylant son résidu tyrosine (Harvey et al., 2005), sa réactivation se produit par déphosphorylation par CDC25 (Matheson et al., 2016).

De plus, la voie ATM/ATR inhibe les kinases de type Polo (PLK1) cette inhibition régule négativement l'activité de CDC25 par conséquent, CDC25 ne peut plus activer le complexe cycline B/CDK1 ce qui inhibe la transition G2/M (Nyberg et al., 2002, Yang, 2018).

Le maintien du point de contrôle G2/M dépend des programmes transcriptionnels régulés par p53, induisant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, notamment p21^{CIP1}, protéines 14-3-3 σ , et GADD45, ces protéines inhibent l'activité des complexes cycline B/CDK1.

La p21 se lie et inactive cycline B/CDK1, la protéine 14-3-3 σ se lie à Cycline B/CDK1 et à CDC25C et les séquestrent dans le cytoplasme, GADD45 permet la dissociation du complexe Cycline B/CDK1 (Chen, 2016 ; Falcicchio et al., 2020; Yang, 2018).

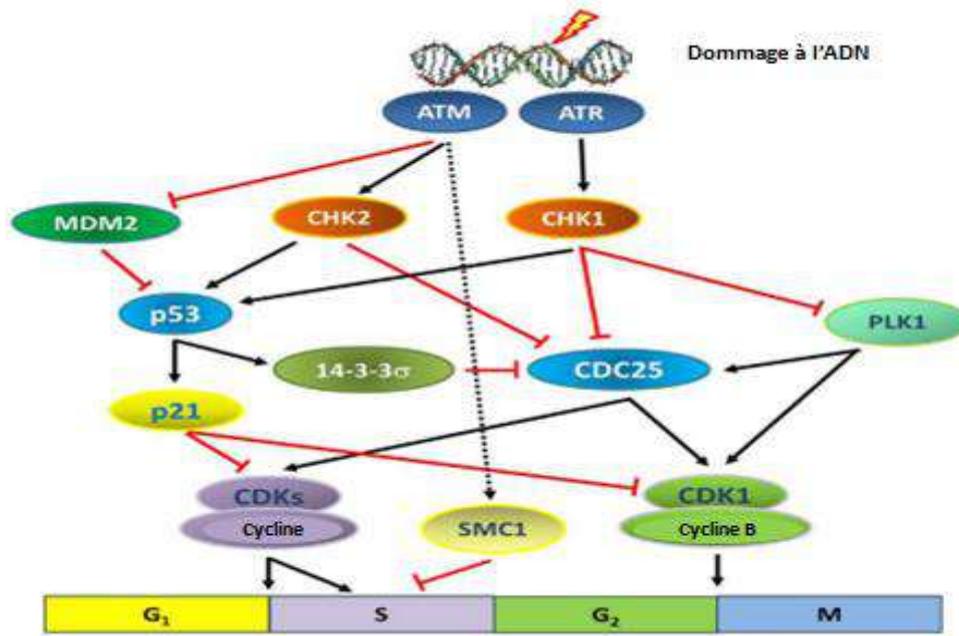


Figure 18. Schéma simplifié des voies de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (Yang, 2018).

III.2.2.3 Point de contrôle intra-S

Avant l'entrée en phase S ou en mitose les cellules dont l'ADN est endommagé répondent aux points de contrôle qui imposent un arrêt du cycle cellulaire en G1 et G2/M, respectivement. Les cellules qui subissent des stress génotoxiques lors de la réplication de l'ADN ne peuvent que retarder leur progression à travers la phase S de manière transitoire.

Le point de contrôle intra-S permet de détecter les dommages à l'ADN induits au cours de la réplication de l'ADN et également les fourches de réplication aberrantes en arrêtant ou en ralentissant la synthèse de l'ADN à l'aide de différents mécanismes. La réplication et la progression de la fourche de réplication sont inhibées lorsque le point de contrôle intra-S est activé réduisant ainsi le taux de réplication de l'ADN (Spoerri et al., 2015; Yang, 2018).

De nombreuses protéines sont impliquées dans le contrôle du point de contrôle intra-S. L'activation des protéines Chk1/Chk2 par ATM et ATR est nécessaire pour initier le point de contrôle intra-S. Lors de la détection des cassures double brin (DSB) de l'ADN Chk1/Chk2 inactivent CDC25A par phosphorylation conduisant ainsi sa dégradation dépendante de l'ubiquitine-protéasome empêchant de ce fait l'activation de complexe cycline A/CDK2, qui,

à son tour, empêche le déclenchement des origines de réplication (Nilsson & Hoffmann, 2000; Yang, 2018).

De plus une deuxième voie médiée par la phosphorylation dépendante de l'ATM d'une protéine de cohésion SMC-1 (structural maintenance of chromosomes) est impliquée dans le ralentissement du taux de réplication dans les cellules qui ont subi des dommages à l'ADN (Yazdi et al., 2002).

III.2.2.4 Point de contrôle du fuseau (transition métaphase-anaphase)

Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau ou SAC est un point de surveillance qui arrête la transition métaphase-anaphase lorsque les chromosomes ne sont pas alignés ou mal attachés aux microtubules jusqu'à ce que tous les chromosomes soient attachés aux fuseaux mitotiques (Musacchio, 2015; Musacchio & Salmon, 2007; Silva et al., 2011).

Les kinétochores des chromosomes non attachés ou mal attachés aux fuseaux agissent comme plate-forme des protéines SAC qui comprennent Mad (mitotic-arrest deficient), Mad1, Mad2, et Mad3 (BubR1 chez l'homme), Bub1 (budding uninhibited by benzimidazole 1) et Bub3, lorsque le SAC est activé le complexe Mad1/c-Mad2 recrute et convertit O-Mad2 (open mitotic arrest deficient 2) cytosolique en C-Mad2 (closed mitotic arrest deficient 2) induisant un changement conformationnel de Cdc20 permettant sa liaison avec BubR1 lié avec Bub3 formant le complexe de point de contrôle mitotique (MCC) (Bokros & Wang, 2016; Diogo et al., 2017; Yu et al., 2006), composé des protéines SAC (BubR1, Bub3, et Mad2) associées au Cdc20 (Logarinho & Bousbaa, 2008; Sudakin et al., 2001), qui à son tour, empêche l'activation de l'ubiquitinylation médiée par le complexe de promotion de l'anaphase E3 ubiquitine ligase /cyclosome (APC/C) de deux substrats clés, la cycline B et la sécurine, empêchant ainsi leur dégradation par le protéosome 26S. La cycline B reste associée à CDK1, tout comme la sécurine avec la séparase ce qui empêche le clivage des cohésines et la séparation des chromatides sœurs, entraînant un arrêt mitotique (Figure 19A) (Diogo et al., 2017; Silva et al., 2011; Sudakin et al., 2001).

Lorsque tous les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique le SAC sera désactivé et le complexes MCC désassemblé ce qui permet l'activation de l'APC/C par Cdc20 et l'ubiquitinylation ultérieure de la cycline B et de la sécurine ce qui favorise la sortie de la mitose (Figure 19B) (Diogo et al., 2017; Reddy et al., 2007; Silva et al., 2014).

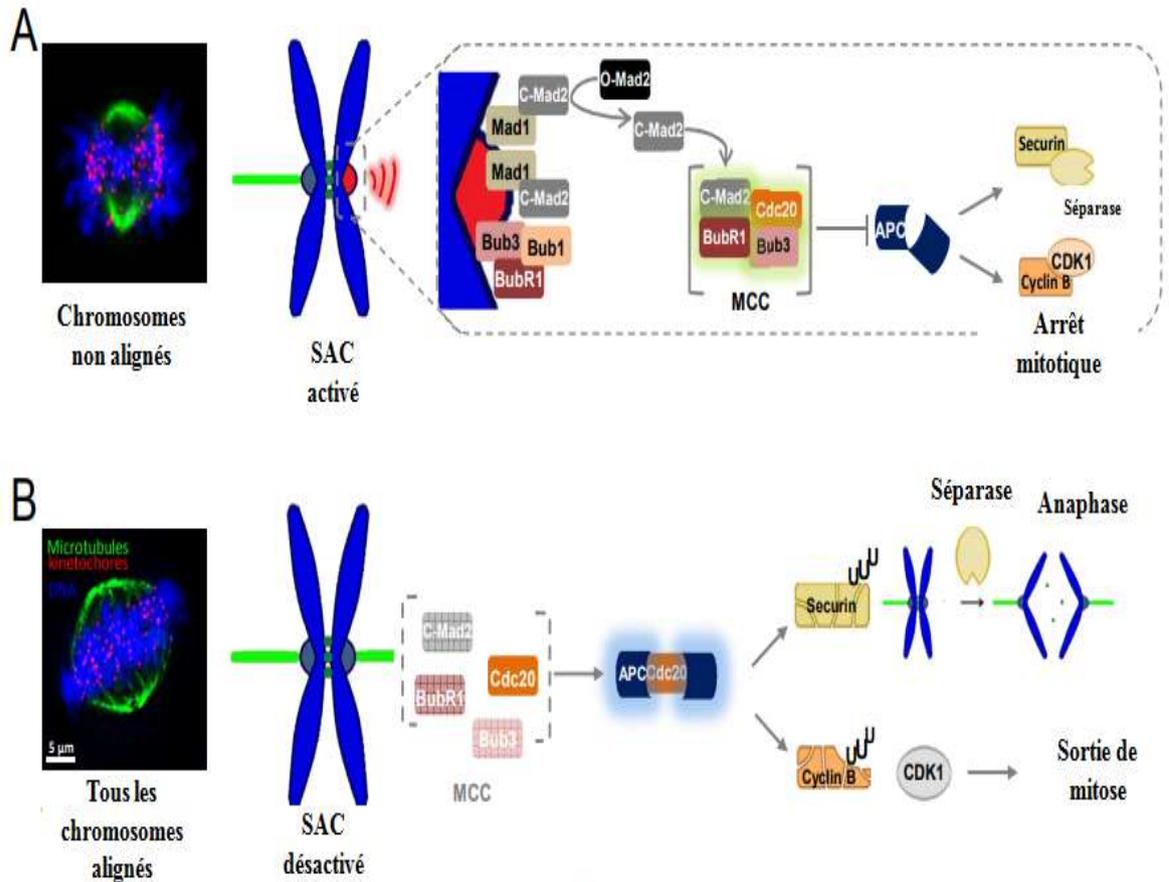


Figure 19. Facteurs contrôlant la transition métaphase-anaphase (Diogo et al., 2017).

III.3 L'apoptose

La mort cellulaire se présente sous diverses formes qui peuvent être induites au sein du même tissu, l'apoptose est la forme la plus rapide, cependant, les autres formes comme la nécrose et l'autophagie peuvent se produire lorsque l'apoptose est inhibée. Nous allons traiter dans cette partie l'apoptose vu son étroite association aux cancers.

L'apoptose fréquemment appelée mort cellulaire programmée est un phénomène physiologique nécessaire pour maintenir l'équilibre homéostatique de l'organisme (Xiang et al., 2016).

La mort cellulaire par apoptose implique une série d'événement finement contrôlés, les cellules en cours d'apoptose mettent en place un mécanisme de suicide qui se traduit par des

changements morphologiques : un rétrécissement cellulaire, un bouillonnement de la membrane, condensation et fragmentation de l'ADN. Au stade tardif du processus, des corps apoptotiques qui correspondent à des fragmentations cellulaire et nucléaire apparaissent, qui sont ensuite rapidement éliminés par les macrophages (Yan et al., 2020).

III.3.1 Les voies de signalisation de l'apoptose

Trois voies de signalisation sont connues pour déclencher la mort cellulaire apoptotique : la voie extrinsèque, la voie intrinsèque et la voie perforine/granzyme (Figure 20 et Figure 21).

III.3.1.1 La voie intrinsèque

Le mécanisme apoptotique dans cette voie cible les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE). Les signaux de stress intracellulaire tel que les ROS, les toxines, les virus, l'irradiation, etc..., conduisent à la perméabilisation de la membrane externe ce qui induit le relargage du cytochrome c dans la matrice cytoplasmique qui va s'associer avec la protéine Apaf 1 (Apoptotic protease activating factor 1) et la procaspase-9 pour former un apoptosome. Ce dernier va activer la caspase-9, la caspase-9 ensuite à son tour active par clivage protéolytique la caspase effectrice 3 ce qui conduit à l'exécution de l'apoptose (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016; Suhaili et al., 2017). Le relargage du cytochrome c est contrôlé par des protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma leukemia) qui peuvent être pro-apoptotique comme Bax (Bcl-2 associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) ou anti-apoptotique comme Bcl-2 et MCL-1 (Myeloid cell leukemia 1) (Elkholi et al., 2001; Jan et al., 2019; Zhang et al., 2016).

De même, Les signaux de stress intracellulaire induisent la libération des ions de calcium par le RE qui stimule la m-calpaïne qui favorise l'activation de la procaspase-12 en sa forme active, cette dernière va activer la caspase-9 qui active finalement la caspase-3 qui induit l'apoptose. Une autre protéine libérée par RE appelée Atf 6- α (Activation transcription factor 6 alpha) est également libérée par le RE lorsqu'il subit un stress, la libération de cette protéine conduit à l'activation de la protéine homologue C/EBP (CHOP) ce qui induit l'apoptose (Chota et al., 2021).

III.3.1.2 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est une voie de signalisation apoptotique initiée par des signaux externes faisant intervenir des récepteurs de mort cellulaire suite à la fixation d'un ligand mortel (Reczek & Chandel, 2017). Il existe différents types de ligands mortels, Fas-L et TNF α et leurs récepteurs respectifs Fas (Fas Cell Surface Death Receptor) et TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) sont les complexes récepteur-ligand les plus impliqués (O' Reilly et al., 2016). Les récepteurs de mort cellulaire appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor Receptor) (Liu et al., 2020).

Ils sont caractérisés par la présence des domaines riches en cystéines dans leur partie extracellulaire qui sont impliqués dans la fixation du ligand (Nagata, 1997) et par des régions hautement conservées dans leur portion intracellulaire appelés domaine de mort (DD, Death Domain) (Tartaglia et al., 1993).

L'activation des récepteurs de mort induit le recrutement des protéines adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain) ou TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) l'interaction de ces protéines avec le récepteur de mort via leur domaine DD et avec la procaspase-8 via son domaine effecteur de la mort dans la partie N-terminale forme un complexe appelé DISC (Death Inducing Signalling Complex), la procaspase-8 est activée par DISC en caspase-8 qui à son tour active par clivage protéolytique la caspase effectrice 3 ce qui conduit à l'exécution de l'apoptose (Figure 20) (Pfeffer & Singh, 2018; Yang, 2015).

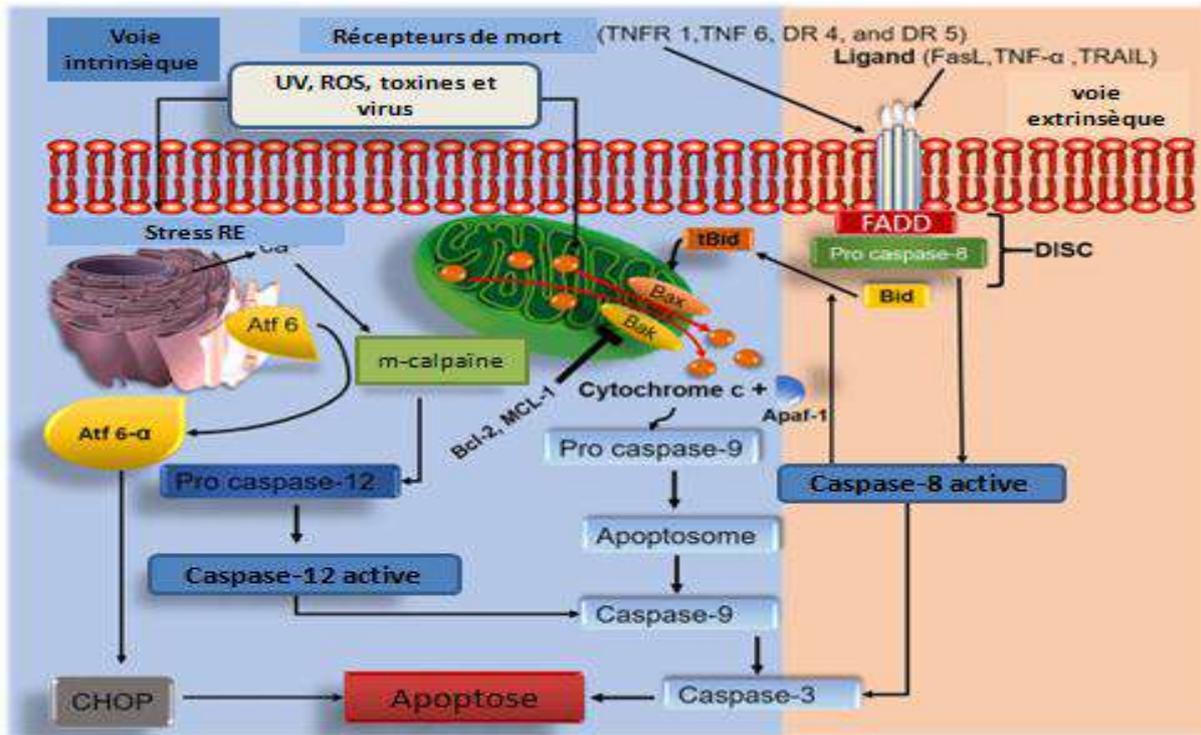


Figure 20. Les voies d’activation de l’apoptose, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Chota et al., 2021).

III.3.1.3 La voie perforine/granzyme

La voie perforine-granzyme est une voie apoptotique médiée par les cellules cytotoxiques, qui impliquent essentiellement deux voies la voie perforine/granzyme et la voie Fas-Fas ligand pour induire l’apoptose (Vermijlen et al., 2002). La perforine est une protéine responsable de la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles elle est sécrétée principalement par les cellules NK, les cellules T CD4+, et CD8+ (Osińska et al., 2014), les granzymes sont des sérines protéases contenues dans les cellules cytotoxiques (García-Laorden et al., 2016), cinq granzymes ont été découvertes chez l’homme A, B, H, K et M (Yang et al., 2019). La perforine induit la mort apoptotique des cellules cibles en créant des pores dans la membrane plasmique permettant l’entrée de granzymes qui sont des molécules lytiques. Il existe deux types de granzymes chez l’homme granzyme A et granzyme B. La granzyme A induit une mort apoptotique via une voie indépendante des caspases, elle cible les mécanismes de réplication de l’ADN en induisant des cassures dans l’ADN qui conduit à un dysfonctionnement cellulaire (Figure 21), et induit également un dysfonctionnement mitochondrial par la production de ROS (Kiselevsky, 2020).

Contrairement au granzyme A, la granzyme B active la voie apoptotique dépendante des caspases elle agit via le clivage de la protéine pro-apoptotique Bid (BH3 interacting domain death agonist). L'interaction de tBid (la forme tronquée de Bid) avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak entraîne la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytoplasme ce qui induit la voie dépendante des caspases (Yang et al., 2019).

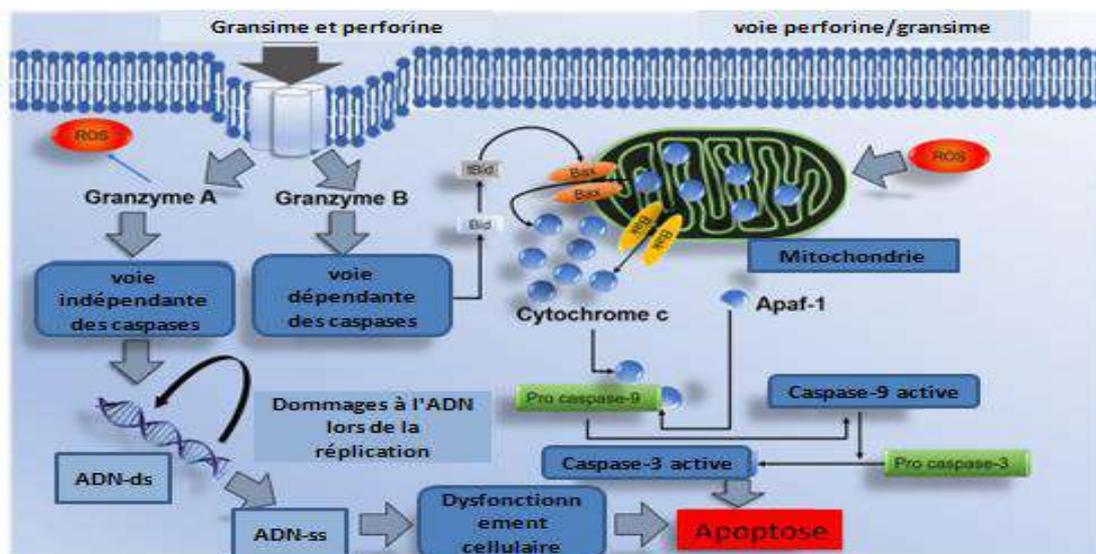


Figure 21. La voie perforine/granzyme (Chota et al., 2021).

III.3.2 Modulateurs de l'apoptose

III.3.2.1 Les caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement des voies apoptotiques (Boice & Bouchier-Hayes, 2020), présentes dans le cytoplasme sous forme de pro-caspases (inactives), elles ont en commun un site actif cystéine «C» et clivent préférentiellement ses substrats cibles après un résidu aspartate « aspase » (Alnemri et al., 1996).

Les caspases sont constituées de trois domaines : d'un pro-domaine localisé dans la partie N-terminale de la protéine, un grand domaine catalytique (p20) situé au milieu de la molécule et d'un petit domaine catalytique (sous unité) localisée dans la partie C-terminale (p10) (Boatright et al., 2003). Les pro-domaines des caspases initiateuses contiennent des domaines

de recrutement des caspases CARD (caspase-2 et 9) et le domaine effecteur de la mort DED (caspase-8 et 10) qui permettent aux caspases d'interagir avec les complexes d'activation, complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) ou l'apoptosome (Hofmann et al., 1997) (Figure 22). Le clivage protéolytique entre les trois domaines est généralement nécessaire pour former une caspase active. L'enzyme active (préformée ou induite) est un hétérotétramère des domaines catalytiques constitués de deux grandes et deux petites sous-unités (p20/p10)₂ (Boatright et al., 2003; Walker et al., 1994) (Figure 23).

Sur la base de leur fonction apoptotique, les caspases sont subdivisées en caspases initiatrices telles que les caspases-2, 8 et 10 et en caspases effectrices qui comportent les caspases-3,6 et 7 (Boice et Bouchier-Hayes, 2020). La caspase-2 est activée par un complexe appelé le PIDDosome (Tinel et Tschopp, 2004) et les caspases-8 et 10 sont activées par le complexe DISC. La formation d'apoptosome par le cyt c et Apaf-1 conduit à l'activation de la caspase-9, les formes de caspases-8 et 9 induisent l'activation des caspases effectrices 3,6 et 7 qui stimulent directement l'apoptose (Courtiade et al., 2011).

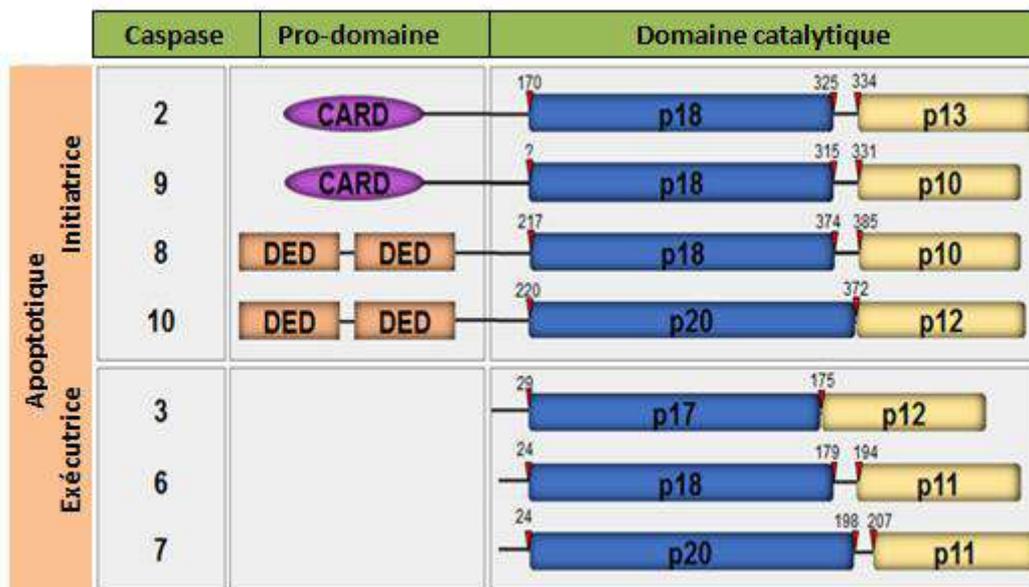


Figure 22. Structure des caspases (Boice & Bouchier-Hayes, 2020).

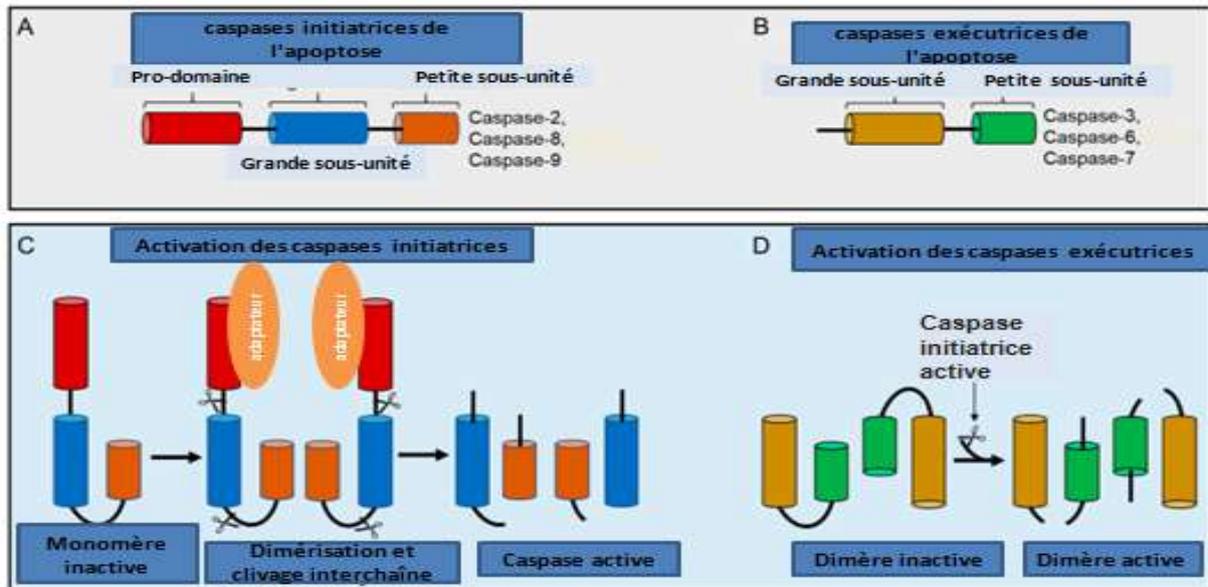


Figure 23. Mécanisme d'activation des caspases (Vigneswara & Ahmed, 2020).

III.3.2.2 Famille de protéines Bcl-2

La famille Bcl-2 est composée de près de 30 protéines, possédant de 1 à 4 domaines d'homologie BH (Bcl-2 homology) (Brunelle & Letai, 2009), sont des régulateurs essentiels de l'apoptose, régulent les voies de signalisation de la mort cellulaire programmée par l'interaction directe avec la membrane externe des mitochondries, cette famille de protéines est divisée en trois sous-groupes (Figure 24) (Pistritto et al., 2016).

Le sous groupe 1 est composé de protéines anti-apoptotiques à 4 domaines BH (Bcl-B, Bcl-2, Bfl-1, Bcl-w, Bcl-xL, et Mcl-1) leur rôle est d'empêcher la libération de cyt c en maintenant les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak sous une forme inactive (Jan & Chaudhry, 2019).

Le sous groupe 2 est composé de protéines pro-apoptotiques à 3 domaines BH (Bax, Bak, et Bok) favorisent la perméabilisation membranaire de la membrane externe mitochondriale ce qui permet la libération de différents facteurs mitochondriaux comme le cytochrome c dans le cytoplasme (MOMP) (Jan & Chaudhry, 2019).

Le sous groupe 3 comporte des protéines plus variées à un seul domaine BH (Bim, Bad, Bid, Puma, et Noxa) ces protéines ont aussi un effet pro-apoptotique (Jan & Chaudhry, 2019). Les protéines Bim et Bid induisent l'activation directe des protéines Bax et Bak .L'activation de ces dernières conduit à la MOMP. La protéine Puma (P53 Upregulated Modulator of Apoptosis) est essentiels dans la régulation de l'apoptose cellulaire, les deux transcrits puma – α et β activent les protéines Bax et Bak via l'action de Bim et Bid (Zhang et al., 2013). Contrairement à d'autres protéines pro-apoptotiques à un seul BH3 qui peuvent se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques, Noxa se lie préférentiellement aux protéines anti-apoptotiques (Mcl-1 et Bfl-1) et inhibe leur activité (Wei et al., 2020). Tandis que la protéine Bad exerce son rôle pro-apoptotique en se liant à Bcl-2 et Bcl-xL inhibant ainsi leur activité anti-apoptotique (Bogdał et al., 2013).

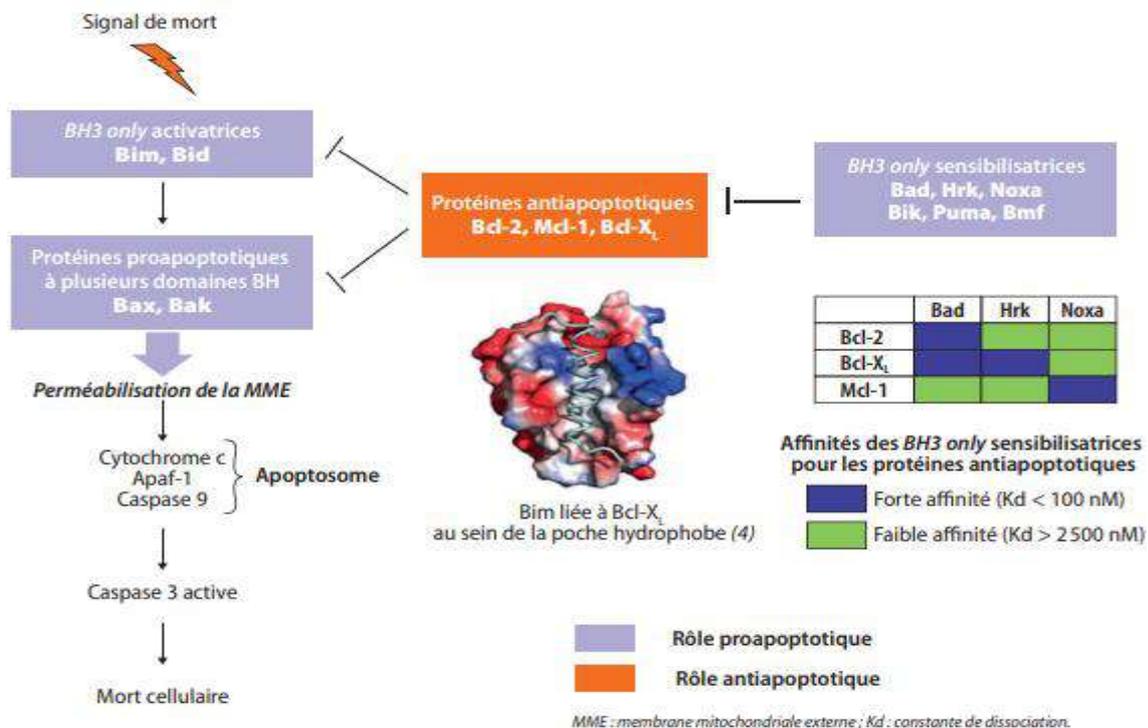


Figure 24. Les protéines de la famille Bcl-2 (Touzeau, 2016).

✓ p53

Le gène suppresseur de tumeur p53, muté dans 50% des cancers humains, code pour une phosphoprotéine nucléaire qui agit comme un facteur de transcription, joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose suite à différents stress cellulaires tels que les dommages de l'ADN et l'hypoxie (Bérout & Soussi, 1998; Levine, 2019), p53 n'empêche pas seulement la transformation des cellules en cellules cancéreuses mais vise également à

éliminer les cellules cancéreuses en induisant un arrêt du cycle cellulaire qui permettra soit la réparation de l'ADN ou bien l'apoptose pour éliminer les cellules dont l'ADN est endommagé (Pistritto et al., 2016).

La protéine p53 régule les deux voies de l'apoptose soit en interagissant avec les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (activités non transcriptionnelles), soit en régulant l'expression de gènes codant ces protéines. Elle peut interagir de façon indépendante de ses activités transcriptionnelles avec les protéines pro-apoptotiques Bak et Bad (Jiang et al., 2006; Leu et al., 2004) et avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Mihara et al., 2003; Tomita et al., 2006). La protéine p53 régule également la transcription des gènes qui codent pour différent membre de la famille Bcl-2, elles répriment la transcription des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Mcl-1 (Miyashita et al., 1994; Pietrzak & Puzianowska-Kuznicka, 2008; Wu et al., 2001) et active la transcription des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme Bax, PUMA, Noxa, Bak et Bid (Li et al., 2008; Nakano & Vousden, 2001; Oda et al., 2001; Pearson et al., 2000; Sax et al., 2002). p53 régule également la transcription des gènes qui codent pour les récepteurs de mort impliqués dans la voie extrinsèque Fas/CD95 (Muller et al., 1998), DR5 (Wu et al., 1997) et le gène codant pour le Fas ligand (Maecker et al., 2000). p53 peut activer également l'expression des protéines pro-apoptotiques comme la protéine adaptatrice Apaf-1 (Robles et al., 2001) et réprimer les protéines anti-apoptotiques comme la survivine (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002), le facteur de croissance FGF1 (Bouleau et al., 2005) et IGFR (Ohlsson et al., 1998).

✓ **Les protéines de la famille des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein)**

Les inhibiteurs des protéines de l'apoptose (IAP) sont une classe de régulateurs de l'apoptose initialement décrites dans le baculovirus (Crook et al., 1993) on compte aujourd'hui huit IAP identifiées chez l'homme dont cIAP-1, cIAP-2 (cellular IAP1 et 2), XIAP (Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996; Rothe et al., 1995), BRUCE/Apollon (Chen et al., 1999), Survivine (Ambrosini et al., 1997), Livine (ML-IAP) (Kasof & Gomes, 2001; Vucic et al., 2000) et NAIP (Roy et al., 1995), qui présentent un rôle crucial dans le contrôle de la survie cellulaire en supprimant à la fois les caspases initiatrices et effectrices (Fulda, 2014; Mohamed et al., 2017). Les membres de la famille des IAPs se définissent par la présence d'un à trois domaine BIR (Baculovirus IAP Repeat) (Wei et al., 2008). Certaines IAP

possèdent un domaine RING (Really Interesting New Gene) dans leur partie C-terminale présentant une activité E3 ubiquitine ligase (Mace et al., 2008). Les IAPs peuvent inhiber les caspases via différents mécanismes XIAP, c-IAP1, c-IAP2, et PNIA inhibent la caspase-3, la caspase-7 et la caspase-9 en se liant via leurs domaines RIB conservés au site actif des caspases inhibant leur fonction protéolytique (Deveraux et al., 1997, 1998, 1999; Roy et al., 1997; Kasof & Gomes, 2001; Maier et al., 2002) ce qui stimule leur dégradation ou leur isolement de leurs substrats (Silke & Meier, 2013). Certaines IAP sont capables d'ubiquitinyler les caspases effectrices 3 et 7 entraînant leur dégradation par le protéasome (Estornes & Bertrand, 2015).

III.4 Traitements du cancer

Pour traiter le cancer, il existe différents types de traitements. Certains patients peuvent n'avoir besoin que d'un seul type de traitement pour être efficace, mais d'autres ont besoin d'une thérapie combinée, tels que la chirurgie, la chimiothérapie et l'immunothérapie, qui peuvent aider à vaincre les tumeurs et à prévenir l'apparition de métastase. Il a été rapporté qu'une combinaison de radiothérapie et d'immunothérapie est bénéfique pour divers types de cancer (Alomari et al., 2016; Haymaker et al., 2017; Sukari et al., 2016).

Cependant, pour certains, une thérapie plus ciblée peut être nécessaire pour des cibles «inaccessibles», telles que le ciblage de récepteur de facteur de croissance épidermique humain (HER2) par un anticorps anti-récepteur, le trastuzumab (Herceptin), ciblant le cancer du sein HER2 positif (Belvin & Mellman, 2015).

Actuellement, la plupart des applications se concentrent sur le ciblage des protéines liées aux tumeurs malignes et sur l'immunothérapie en raison de leur efficacité accrue avec moins d'effet secondaire par rapport à la radiothérapie ou à la chimiothérapie. Les agents immunostimulateurs, tels que les adjuvants, les cytokines et les anticorps monoclonaux, présentent un grand potentiel pour le traitement du cancer.

La chirurgie est l'une des thérapies les plus efficaces pour l'élimination des tumeurs localisées, cependant, dans les cas où le cancer devient métastatique, la chirurgie devient inefficace et la chimiothérapie devient la thérapie la plus prometteuse (Yau et al., 2021). La

chimiothérapie peut provoquer des effets secondaires désagréables, développer une résistance, et présenter une cytotoxicité non sélective contre les cellules normales.

D'autre part les plantes sont une source viable de produits naturels actifs qui servent de ressources vitales dans le traitement de cancer par exemple (l'étoposide, la vincristine, la vinblastine, la camptothécine, et la podophyllotoxine, etc.), et des ressources de nouveaux médicaments. Ils représentent également une excellente ressource pour les thérapies ciblées. Les composés phytochimiques et les mélanges à base de plantes sont multispécifiques, ils agissent en attaquant plusieurs cibles en même temps.

De nombreux composés naturels possèdent des propriétés anticancéreuse et cytotoxique. Il a été rapporté que les flavonoïdes, tels que la quercétine, le kaempférol, la myricétine, et la rutine présentent une activité anticancéreuse. La nature cytotoxique des triterpénoïdes tels que l'acide oléanolique, l'acide ursolique, les acides boswelliques, l'acide pomolique, les avicines et les acides fomitelliques est bien documentée, de plus, les activités anticancéreuses d'alcaloïdes tels que la sanguinarine et la matrine ont également été rapportées (Efferth et al., 2017; Gulfishan et al., 2018; Jain et al., 2016).

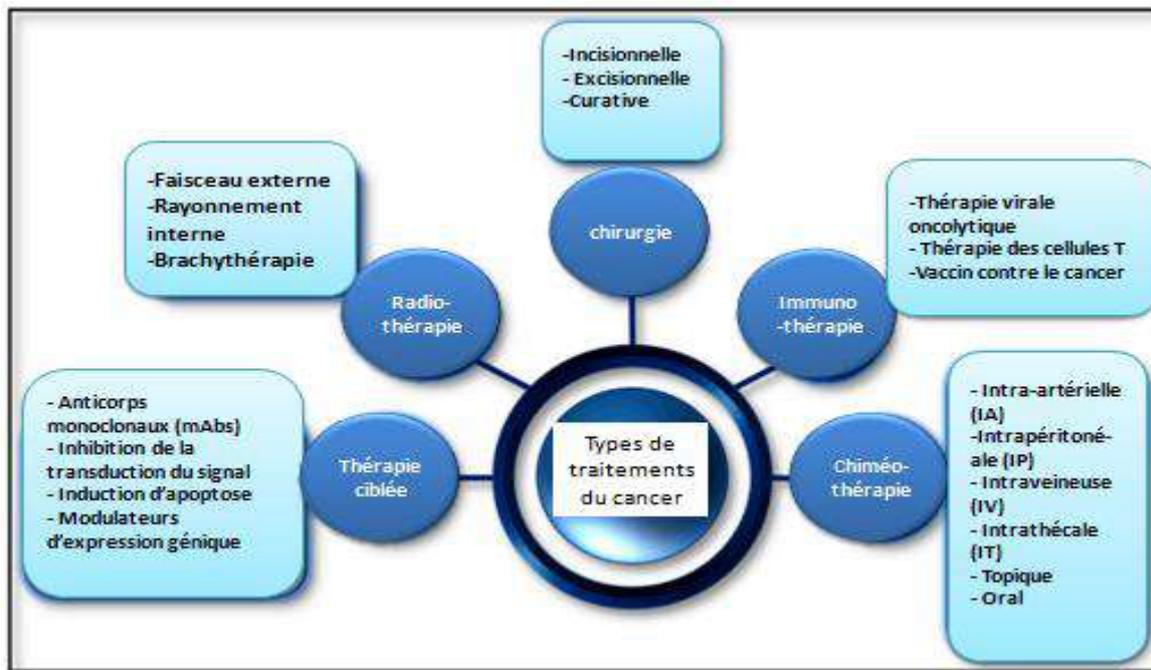


Figure 25. Les principales stratégies utilisées dans le traitement des cancers

(Yau et al., 2021).

Chapitre IV. Chromatographie liquide et ses couplages

IV .1 Chromatographie liquide

IV.1.1 Généralités

Chromatographie liquide (LC : Liquide Chromatography) est une technique de séparation physique des composants individuels d'un mélange liquide ou une solution d'un mélange solide. Cette séparation implique l'utilisation de deux phases, une phase mobile polaire et une phase stationnaire apolaire (solide ou liquide) (Scott, 1992).

Sur la base du mécanisme d'interaction entre les composants d'échantillon et la phase stationnaire, les séparations LC ont été classées en différents modes, tels que :

- Chromatographie d'adsorption : sépare les composants d'un mélange en fonction de leur capacité à se lier à la phase stationnaire.
- Chromatographie de partage : basée sur la solubilité et l'hydrophobicité différentes des substances à séparer dans la phase stationnaire par rapport à la phase mobile, deux fluides parfaitement miscible.
- Chromatographie échangeuse d'ions : La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases, elle sépare les composants d'un mélange sur la base de leurs charges ioniques.
- Chromatographie d'exclusion de taille : également appelée filtration sur gel ou chromatographie par perméation de gel, exploite les différences de taille des molécules pour les séparer.

IV.1.2 Chromatographie liquide à haute performance

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC : High Performance Liquid Chromatography) est une technique de séparation analytique et/ou préparative, avec une large gamme d'application, utilisée dans la séparation, identification et quantification des composés actifs d'un mélange. Le principe de base en HPLC est l'adsorption, cette technique consiste à injecter de 0,1 µL jusqu'à 100 µL de l'échantillon contenant les molécules à séparer avec précision à l'aide d'un échantillonneur automatique (Dolan & Snyder,1989), le volume d'injection optimal dépend des conditions expérimentales, la phase mobile est pompée en

continue et à haute pression dans une colonne généralement remplie de de particules de forme irrégulière ou sphérique (phase stationnaire), les composants interagissent différemment avec la phase stationnaire en fonction de leur composition chimique et/ou leurs propriétés physiques. Certaines molécules interagissent plus fortement avec la phase stationnaire que d'autres, les molécules qui interagissent moins avec la phase stationnaire sortent en premier de la colonne, le restes de molécules sont éliminées au fur et à mesure que la phase mobile continue de s'écouler dans la colonne, et ceux avec l'interaction la plus fortes sortent en dernier. Le temps qu'un composé spécifique passe dans la colonne est appelé temps de rétention (TR), Chaque molécule est identifiée par son TR (Scott, 1992 ; Kumer et al.,2016 ; Malviya et al.,2010).

La méthode HPLC se divise en deux sous-classes différentes basées sur le type de la phase stationnaires et la polarité de la phase mobile :

- ✓ Chromatographie liquide en phase inversée : utilisation des mélanges aqueux-organiques tels que l'eau-acétonitrile et l'eau-méthanol comme phase mobile et l'octadécylsilyle (C18) et de particules organiques modifiées apparentées comme phase stationnaire apolaire avec des particules pures ou à pH ajusté.
- ✓ Chromatographie liquide en phase normale : utilisation de phase stationnaire polaire comme gel de silice avec des mélanges organiques purs ou mixtes.

Chromatographie liquide en phase inversée est la technique la plus souvent utilisée dans l'instrumentation LC-MS.

IV.2 Spectrométrie de masse (MS : masse spectrometry)

Le domaine de la MS est relativement récent. La première MS a été développée au début des années 1900. L'existence de l'isotope, qui n'avait pas de radioactivité, a été découverte par la SM. Il s'agissait d'une découverte importante dans le domaine de la chimie, qui a permis de découvrir la plupart des isotopes connus dans les 20 années suivantes. Cependant, la gamme de masses mesurables de la MS était encore limitée aux molécules de faible poids moléculaire. Ce n'est que dans les années 1990 que des masses moléculaires d'environ 10 000 Da ont pu être mesurées par MS. Dans les années 1990, les méthodes d'ionisation par ESI (Electron Spray Ionization) et MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) ont été

développées, permettant de mesurer des matériaux de plus grande masse moléculaire (Fenn et al., 1989; Tanaka et al., 1988).

Ces deux méthodes d'ionisation sont utilisées pour ioniser les molécules cibles dans les mesures MS. L'ESI utilise l'énergie électrique pour faciliter le transfert des ions de la solution vers la phase gazeuse. Les espèces ioniques en solution peuvent être analysées par ESI-MS avec une sensibilité accrue. Les composés neutres peuvent également être convertis en une forme ionique en solution ou en phase gazeuse par protonation ou cationisation.

MALDI est une désignation abrégée de désorption/ionisation laser assistée par matrice. La définition exacte de la matrice est indéfinie, car elle absorbe généralement un faisceau laser, ce qui favorise l'ionisation d'un échantillon (Noda et al., 2016).

MS est une technique analytique puissante utilisée pour la caractérisation structurale des molécules organiques, solides, liquides et gazeuses. MS peut déterminer également la masse de la molécule et les masses de fragments de celle-ci, et de corréler le spectre de composé obtenu avec sa structure, cette technique est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifique : physique, chimie, biologie, médecine, pharmacologie, science de l'environnement, l'alimentation et l'agriculture grâce à sa sensibilité, spécificité, vitesse et simplicité (Chughtai & Heeren, 2010; Hofmann, 1999; McLafferty, 1981).

MS est constitué principalement de :

- ✓ Système d'introduction de l'échantillon
- ✓ Source d'ions ou chambre d'ionisation
- ✓ Analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge (rapport m/z)
- ✓ Détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur couplé à un système informatique assurant le traitement des données obtenues

IV.3 LC-MS

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est une technique analytique qui implique la séparation physique des composés cibles (analytes) suivie de leur détection basée sur la masse, sa sensibilité, sélectivité et sa précision en ont fait une technique de choix pour détecter des quantités en microgrammes ou même en nanogrammes d'une variété d'analytes telles que, les métabolites, médicaments, pesticides et extraits de produits naturels (Bhole et al., 2020; Pitt, 2009).

Bien qu'une grande variété de détecteurs de technologies et de sensibilités différentes aient été couplés à la LC pour analyser différents types d'échantillons, le spectromètre de masse est devenu un détecteur sélectif, sensible et universel (Medhe, 2018).

Contrairement à d'autres détecteurs, l'éluant LC transportant les analytes séparés et ne s'écoule pas dans le spectromètre de masse. Alors que le système LC fonctionne à des pressions ambiantes, sous vide et les deux sont couplés via une interface. Lorsque l'éluant de la colonne s'écoule dans l'interface, le solvant est évaporé par application de chaleur et les molécules d'analyte sont vaporisées et ionisées. Il s'agit d'une étape cruciale car le spectromètre de masse n'est capable que de détecter et de mesurer les ions en phase gazeuse. Comme les ions analytes sont générés à la pression atmosphérique dans l'interface, le processus est appelé ionisation à pression atmosphérique (API) et l'interface est connue sous le nom de source API. L'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont les sources les plus couramment utilisées dans l'analyse LC-MS (Hayen et al., 2009).

Les ions analytes sont attirés dans le spectromètre de masse où ils sont soumis à des champs électriques et/ou des champs magnétiques. Les trajectoires de vol des ions sont modifiées en faisant varier les champs appliqués, ce qui assure leur séparation les uns des autres sur la base de leurs valeurs de masse à charge (m/z). Après la séparation les ions peuvent être collectés et détectés par une variété de détecteurs de masse, dont le plus courant est le multiplicateur d'électrons. Lorsque les ions séparés frappent la surface du multiplicateur d'électrons (une dynode), des électrons secondaires sont libérés. Ces électrons secondaires sont multipliés en les cascades à travers une série de dynodes. Le courant amplifié généré par le flux des électrons secondaires est mesuré et corrélé aux concentrations d'ions dans le spectromètre de masse à un instant donné dans le temps (Parasuraman et al., 2014; Krueve et al., 2015; Shah et al., 2021).

IV.3.1 Domaines d'application de LC-MS

LC-MS est la technique plus largement utilisée dans les industries pharmaceutiques, chimiques et alimentaires, pour l'analyse quantitative et qualitative (Kaufmann et al., 2002; Lee & Kerns, 1999; Prakash et al., 2007).

Les applications de LS-MS sont comme suit: (Figure 26)

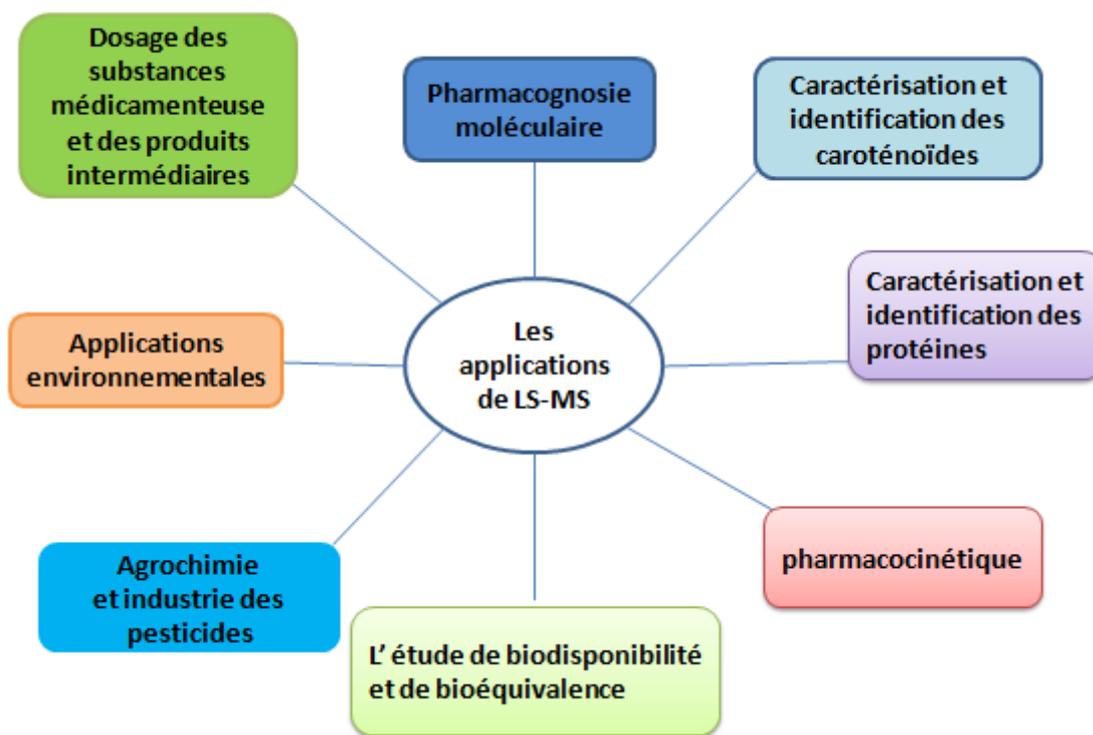


Figure 26. Domaines d’application de la technique LC-MS (Shah et al., 2021).

IV.3.2 Avantages et inconvénients de LC-MS

- **Avantages**

Le LC-MS présente divers avantages par rapport aux autres méthodes chromatographiques, dont quelques-uns sont les suivants (Shah et al., 2021),

- ✓ Sélective : elle peut isoler et identifier des constituants ciblés
- ✓ Sensibilité plus élevée
- ✓ Identifie des composés connus et inconnus
- ✓ Les données quantitatives et qualitatives des composés isolés peuvent être obtenues facilement
- ✓ Analyse des composés polaires et non polaires, ainsi que des molécules thermolabiles
- ✓ Isole et identifie facilement les composés élués sans validation du temps de rétention
- ✓ la fragmentation contrôlée fournir les données structurales possibles

- **Inconvénients**

- ✓ Les instruments LC-MS sont coûteux. Une expertise est nécessaire pour faire fonctionner les instruments et analyser les données
- ✓ Le débit d'échantillons est limité par rapport aux autres techniques d'analyse
- ✓ Sensibilité à la concentration moins favorable
- ✓

IV.4 Chromatographie liquide Spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

LC-MS/MS est considérée comme une technique analytique universelle très puissante, permet une analyse qualitative et quantitative (Brown, 1990), elle associe le pouvoir de séparation par la chromatographie en phase liquide d'une large gamme de composé.

IV.4.1 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Tandem MS/MS se différencie de la MS par sa capacité à fragmenté les ions séparés par le premier analyseur MS pour une identification plus fin et plus exact, il comporte au minimum deux analyseurs en série séparés.

La Spectrométrie de masse en tandem se divise en instruments à faible et haute résolution de masse (Figure 27). Les spectromètres de masse triple quadripôle (QqQ-MS) et quadripôle à temps de vol (QTOF) et quadripôle Orbitrap (Q Orbitrap) sont les spectromètres de masse en tandem les plus couramment utilisés (Rochat, 2018; Weinmann et al., 2000).

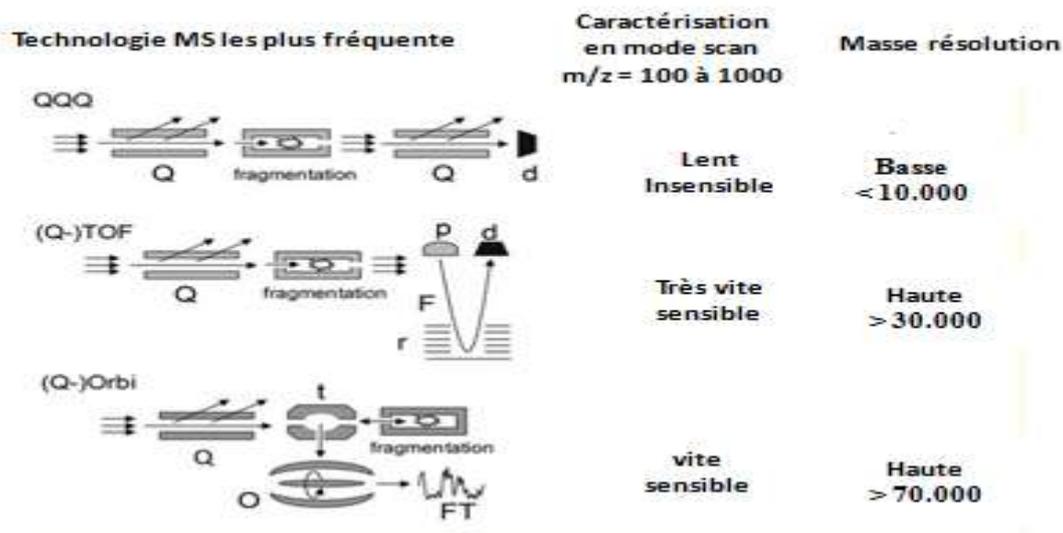


Figure 27. Caractéristiques vitesse et résolution de masse des spectromètres de masse en tandem les plus fréquents (Rochat, 2018).

IV.4.1.1 Spectromètres de masse triple quadripôle (QqQ)

Le spectromètre de masse triple quadripôle (QqQ) est un outil analytique standard pour les applications GC-MS/MS et LC-MS/MS utilisé dans les cas où une quantification précise est souhaitée, il a été continuellement amélioré depuis son introduction (Yost & Enke, 1978; Yost et al., 1979; Yost & Enke, 1979) en termes de plage de masse, résolution et de sensibilité (Hunt et al., 1980; Dawson et al., 1982; Dawson et al., 1982). Il se compose d'une source d'ionisation, il existe plusieurs sources d'ionisation, l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont les sources les plus couramment utilisées dans l'analyse LC-MS (Forcisi et al., 2013). permettent d'évaporer et d'ioniser l'éluant sortant de la LC, de trois analyseurs quadripolaires successifs (Figure 28): un quadripôle Q1 (premier analyseur) sert de MS1 suivi d'un quadripôle Q2 (chambre de collision), puis d'un quadripôle Q3 (deuxième analyseur) sert de MS2 qui analyse les ions sortant de Q2.

Le rôle de Q1 et Q3 est de sélectionner et séparer les ions collectés selon leur rapport masse sur charge (m/z), Q2 sert comme cellule de collision qui guide les ions pour les fragmenter (Gross, 2017) et d'un détecteur et dispositif de traitement, plusieurs types de détecteurs ont été développés, le détecteur au multiplicateur d'électron est le plus utilisé, il

transforme les ions en signal électrique, mesure le nombre d'électron et amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité, le signal est ensuite enregistré et un spectre de masse est produit (Medhe, 2018).

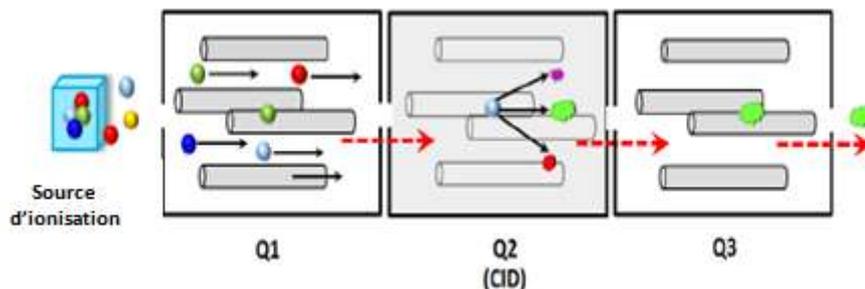


Figure 28. Spectrométrie de masse triple quadripôle (QqQ) (Domingues et al., 2018).

✓ Principe de l'analyse LC-QqQ-MS/MS

L'analyse LC-MS/MS consiste à injecter l'échantillon à analyser dans une colonne de chromatographie liquide (LC) qui traverse la phase stationnaire par une phase mobile, l'interaction chimique entre les composants de l'échantillon et les deux phases affecte différentes vitesses de migration ce qui facilite l'élution des constituants de l'échantillon, après l'élution l'effluent est dirigé vers une source d'ionisation du spectromètre de masse qui produit des ions négatifs et positifs, les ions résultants migrent ensuite sous vide, sur la base du spectre de masse obtenu lors de la première MS (premier quadripôle) un ion est sélectionné en Q1, l'ion sélectionné est fragmenté en ions fille dans la cellule de collision (Q2) en percutant un gaz inerte, ensuite un ion spécifique est ciblé par un troisième quadripôle (Q3), les ions isolés sont ensuite détectés par un multiplicateur d'électrons (Figure 29) (Domingues et al., 2018; Hunt et al., 1986; McLafferty, 1981; Saibaba et al., 2016).

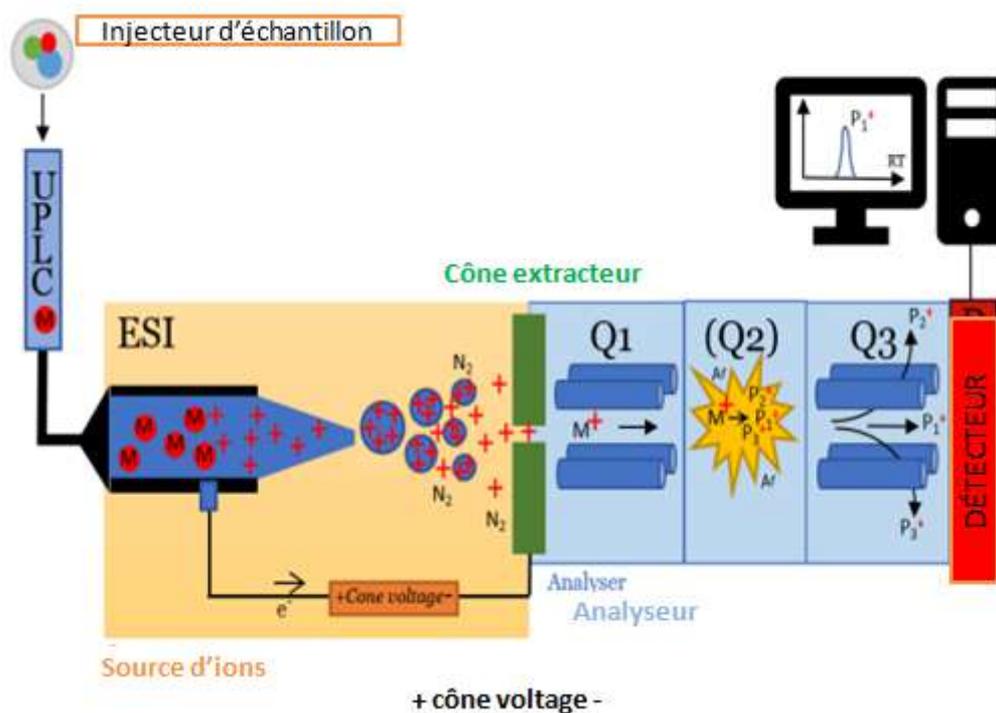


Figure 29. Principe de l'analyse LC-QqQ-MS/MS (ionisation par electrospray en mode positif (ESI+)) (Zimdahl Kahlin et al., 2021).

IV.4.1.2 Spectromètre de masse Q-TOF

Q-TOF est un spectromètre hybride à haute résolution (HRMS) constitué de double quadripôle un analyseur (Q1) et une cellule de collision (q) qui sépare la premier analyseur de deuxième et d'un second analyseur à temps de vol (Figure 30), il combine la capacité de Q1 a transmettre les ions et a isoler un ion précurseur spécifique qui sera ensuite fragmenté dans la cellule de collision avec la résolutions de masse élevées et la grande vitesse de du ToF, les ions sortant de la cellules de collision seront soumises à une différence de potentiel dans la zone d'accélération dans l'analyseur TOF permettant l'acquisition d'une énergie cinétique ce qui permet aux ions de parcourir la zone de vol, ou elle s'effectue la séparation, les ions avec des valeurs m/z différentes se déplacent à des vitesses différentes, les ions seront séparés en fonction du temps qu'ils mettent à parcourir la zone de vol (Bouchonnet, 2009; Rochat, 2018).

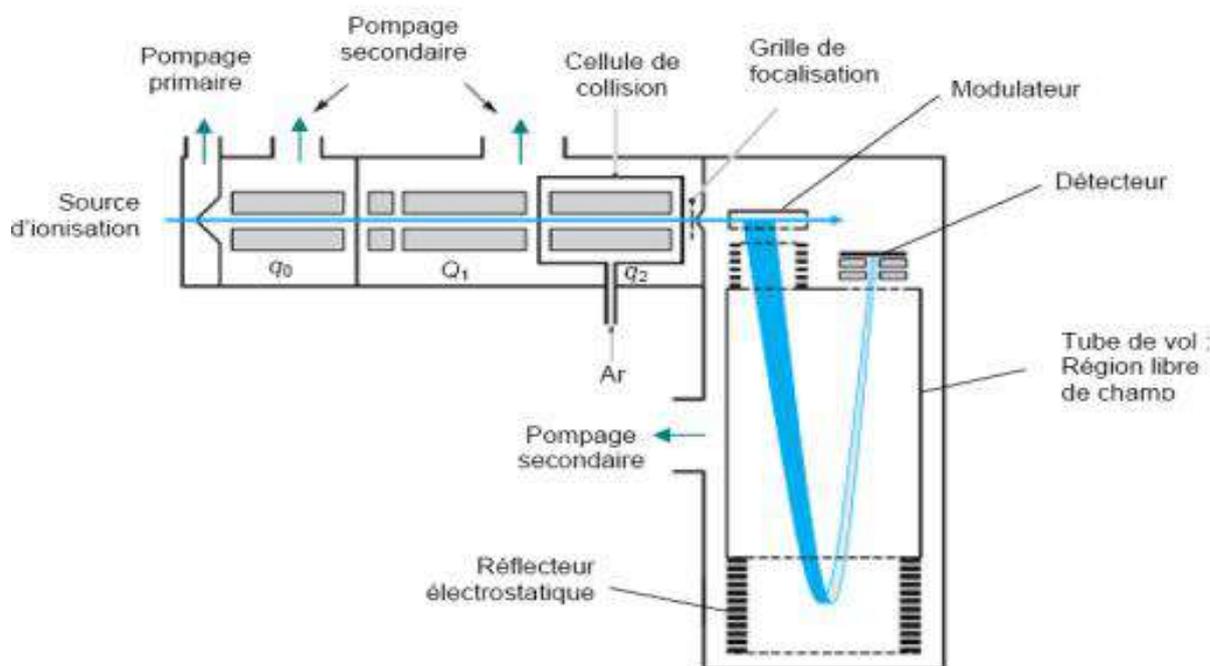


Figure 30. Spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF) (García-Reyes et al., 2017)

V.4.1.3 Spectromètre quadripôle-Orbitrap (Q-Orbitrap)

Q-Orbitrap est un spectromètre hybride à haute résolution (HRMS) constitué d'une source d'ionisation, un guide d'ions à anneau empilé (lentille S), un filtre de masse quadripolaire, un piège C (C-trap), une cellule de collision en mode HCD (Higher-energy collisional dissociation) c) et un analyseur de masse Orbitrap caractérisé par une résolution et précision de masse très élevée permettant la détection, l'identification et la confirmation d'un grand nombre de constituant d'un échantillon et utilisé dans de nombreuses applications qualitatives et quantitatives (Figure 31).

Les ions formés dans la source d'ionisation passent à travers un système de S-lentille constitué d'une série de lentilles de focalisation, les ions ensuite se dirigent vers un quadripôle via la flatapôle, après refroidissement par collision dans le flatapôle courbé le quadripôle filtre et sélectionne les ions précurseurs avec une grande précision, les ions ensuite entrent dans le C-trap interfacé à une cellule HCD à champ axial où ils seront fragmentés puis transférés à nouveau dans le C-trap qui accumule et éjecte les ions dans l'orbitrap permettant une détection à haute résolution et grande précision (Eliuk & Makarov, 2015; Michalski et al., 2011).

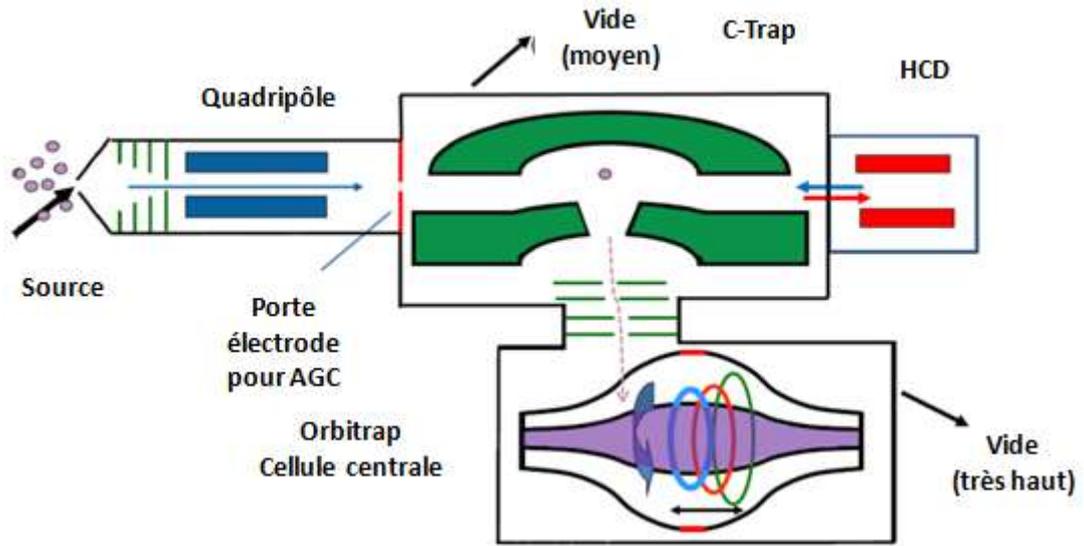


Figure 31. Spectromètre de masse hybride Quadrupôle/Orbitrap (Kaufmann, 2018).

Partie II

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

I.1 Récolte du matériel végétal

La plante *L. numidicum* a été récoltée en juin 2018 à Djebel Babor, Sétif (Nord-Est algérien), tandis que la récolte de *L. trigynum* a été faite en juin 2017 dans la région du Djebel El-Ouahch à Constantine (Nord-Est Algérien). Les deux plantes utilisées dans l'étude ont été authentifiées par Prof. Gérard de Bélair (LOST.LN.06.18 et LOST.LT.06.17).

Les parties aériennes des plantes ont été séchées à l'ombre à température ambiante puis broyées en petits morceaux et pesées.

I.2 Les étapes d'extraction des parties aériennes de *L. numidicum* et *L. trigynum*

Le protocole d'extraction le plus utilisé est basé sur la macération de la poudre de chaque plante pesée, dans l'éthanol ou le méthanol suivie de l'extraction du type liquide-liquide avec divers solvants de polarités croissantes tels que l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

Les parties aériennes (900g) ont été mises en macération à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O, 80:20, v/v) 3 fois pour une période de 24 heures. Le solvant a été évaporé à 40 °C, sous pression réduite, jusqu'à l'obtention d'extrait concentré. L'extrait brut obtenu est repris avec de l'eau distillée (1000 mL) pour obtenir une solution aqueuse puis laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de poussière, cire, etc. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par des extractions liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante (3 x 300 mL) en commençant par l'éther de pétrole, chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques obtenues sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées (Figure 32).

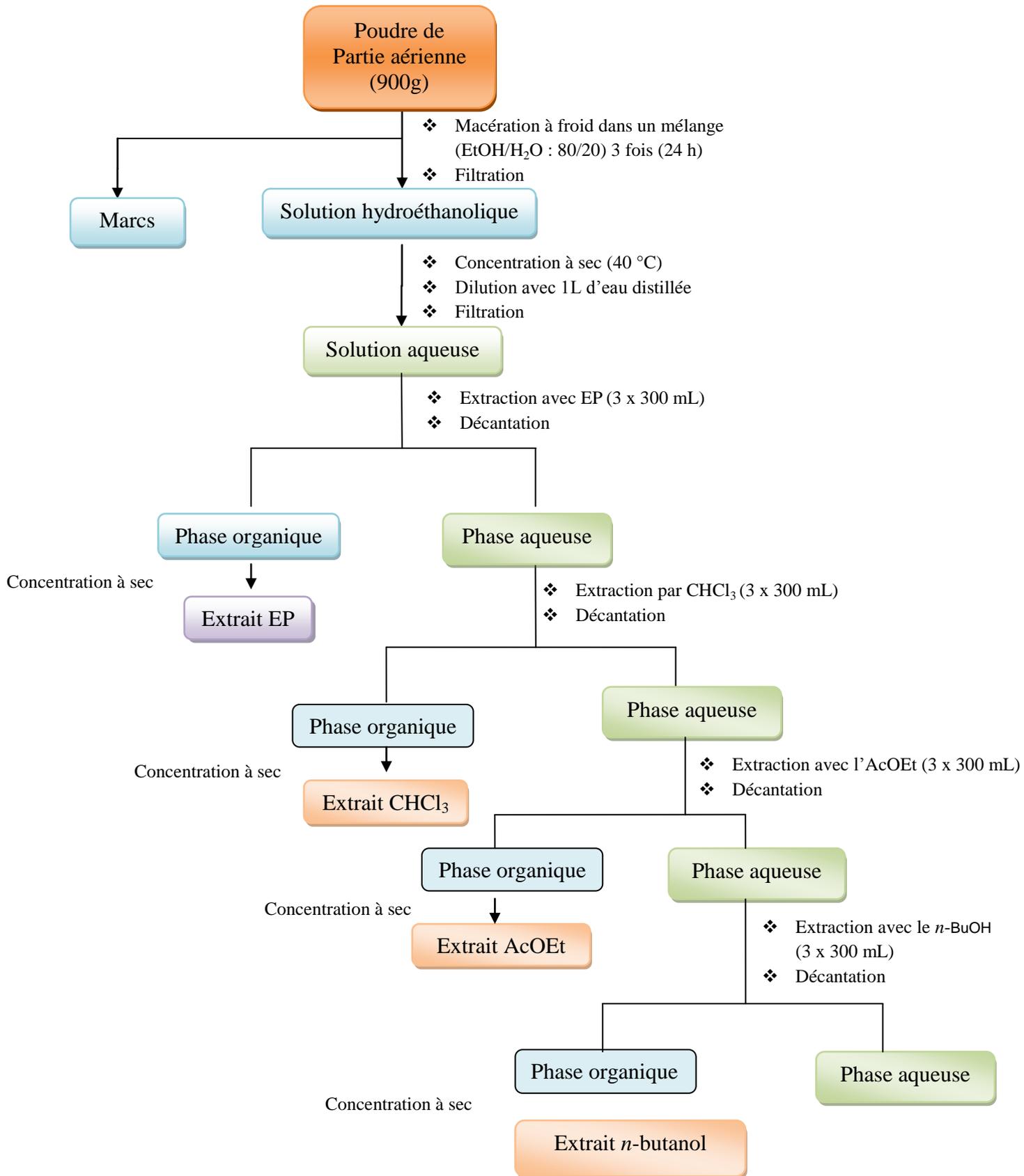


Figure 32. Protocole d'extraction

Le rendement d'extraction (%) est calculé selon la formule suivante:

$$R\% = \frac{M}{M_0} \times 100$$

R%: Rendement en %

M : Masse en gramme de l'extrait sec

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal.

I.3 Fractionnement d'EBLN par chromatographie liquide sous vide (VLC)

✓ Principe

Cette technique chromatographique est particulièrement employée pour le fractionnement d'extraits végétaux complexes, permettant l'obtention rapide de fractions chimiquement simplifiées. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes chromatographiques classiques.

La rapidité de cette méthode évite les phénomènes d'isomérisations observés souvent dans le cas de la chromatographie sur colonne.

Des chromatographies en phase inverse (sur une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck 40-63 µm), sont préconisées pour les extraits polaires et silice normale Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) pour les extraits apolaires.

Les fractionnements ont été effectués dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n°4.

✓ Protocole de fractionnement de l'EBLN par VLC

L'extrait *n*-BuOH de *L. numidicum* (EBLN) (12.19 g) a été fractionné par VLC en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice greffée en C-18 et un mélange Méthanol/H₂O à différents gradients (20/80, 30/70, 40/60, 60/40, 80/20 et 0/100) comme phase mobile. Des fractions de 250 mL (3) sont recueillies pour chaque mélange et analysées par chromatographie sur couche mince.

Le suivi de la VLC est effectué par CCM dans le système (CHCl₃ : MeOH : H₂O) (8:2:1). Les CCM ont été examinées sous UV (lampe de wood) et révélées avec le mélange (acide

acétique : acide sulfurique : H₂O) (8:1:4) puis chauffées à 100 °C. 6 fractions ont été récoltées après rassemblement des fractions présentant des similitudes (Figure 33).

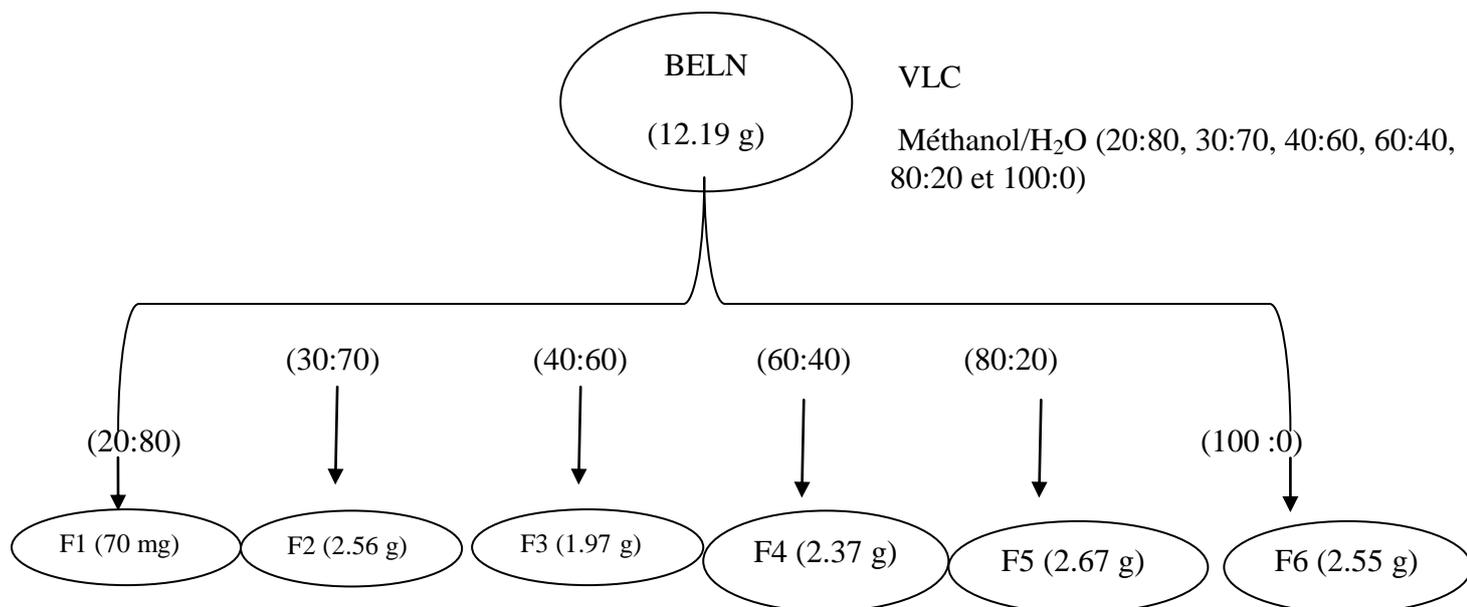


Figure 33. Schéma de fractionnement de l'EBLN

II. Détermination de la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes de l'EAELN et l'EAELT

II.1.1 Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (Muller et al. 2010), en utilisant l'acide gallique (25-200 µg/mL) comme standard.

Le réactif FCR (acide phosphotungstique + acide phosphomolybdique) est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène ce qui produit une

coloration bleue proportionnelle à la teneur en phénols totaux avec une absorption aux environs de 750 -765 nm (Boizot & Charpentier, 2006).

Un volume de 20 µL d'extrait de plante (1 mg d'extrait dissout dans 1 mL d'eau distillée ou méthanol) sont mélangés avec 100µL de FCR dilué (1:10) et 75 µL de carbonate de sodium (7,5%).

Après 2h de réaction à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. Le contenu phénolique total a été exprimé en µg Equivalent d'Acide Gallique par gramme d'échantillon (µg GAE/mL).

II.1.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est basé sur la formation d'un complexe de coloration jaunâtre entre Al^{+3} et le groupement OH libre en position 5 des flavonoïdes (Riberau-Gayon, 1968). La méthode de Topçu et al., 2007 à été utilisée avec quelques modifications.

Un volume de 50 µL de chaque solution d'extrait (contenant 1mg) ou standard ont étaient transférés dans une microplaque à 96 puits avec 130 µL de MeOH, 10 µL d'acétate de potassium (CH_3COOK) 10 M et 10 µL de nitrate d'aluminium à 10% ($Al(NO_3)_2, 9H_2O$).Après 40 min à température ambiante, l'absorption a été lue par spectrophotométrie à 415 nm. La coloration jaunâtre est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes

La quercétin a été utilisée comme standard et les valeurs sont exprimées en µg équivalent de quercétine/mL (µg QE/mL).

III. Activités antioxydante et anticholinestérase de l'EAELN et l'EAELT

III.1 Activité antioxydante

Les effets antioxydants de l'EAELN et l'EAELT ont été évalués *in vitro* par plusieurs méthodes complémentaires (DPPH, ABTS, CUPRAC, phénanthroline, et piégeage des radicaux galvinoxyles).

III.1.1 Piégeage du radical libre DPPH

✓ Principe

L'activité antiradicalaire est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois, 1958). Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violette en solution qui devient jaune (diphénylepicyl-hydrazine) quand il est réduit par une substance réductrice (un donneur de proton H⁺) (Figure 34).

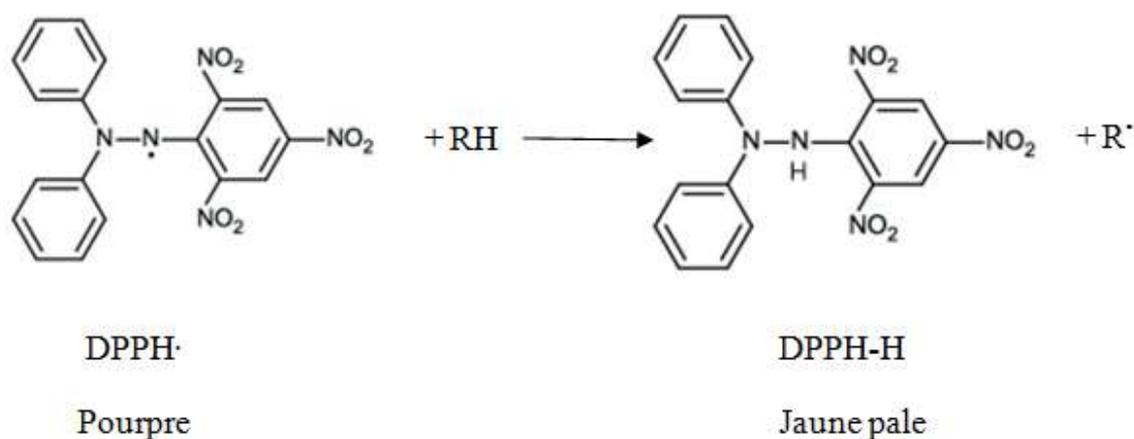


Figure 34. Transformation du radical DPPH• en DPPHH (Liang & Kitts, 2014).

✓ Mode opératoire

Une solution à 0,1 mM de DPPH a été préparée dans le méthanol et 160 µL de cette solution ont été ajoutés à 40 µL de solutions d'échantillon à différentes concentrations, 30 min plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

La solution de DPPH dans MeOH a été utilisée comme témoin et BHT et BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) est calculé par la formule suivante :

$$\%I = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A_{Blanc} : Absorbance de contrôle en absence de l'échantillon

A_{Extrait} : Absorbance en présence de l'échantillon (BHT ou BHA)

III.1.2 Piégeage du radical libre ABTS^{•+}

✓ Principe

La méthode ABTS est considérée comme l'une des techniques les plus sensibles pour identifier l'activité antioxydante.

Cette méthode est basée sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique coloré ABTS^{•+} (l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), un radical libre et stable de couleur bleu-verte, formé par l'oxydation de l'ABTS par la méthémoglobine et le peroxyde d'hydrogène (Hernández-Rodríguez et al., 2019).

Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Rice-Evans & Miller, 1994 ; Rice-Evans et al., 1995).

L'ajout d'antioxydants à ce radical suit un mécanisme de transfert d'électrons (Lee et al., 2016; Re et al., 1999) (Figure 35), qui se visualise comme une décoloration de la solution où le radical ABTS il est réduit par l'antioxydant (Floegel et al., 2011). Le degré de décoloration permet d'évaluer le pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS^{•+}.

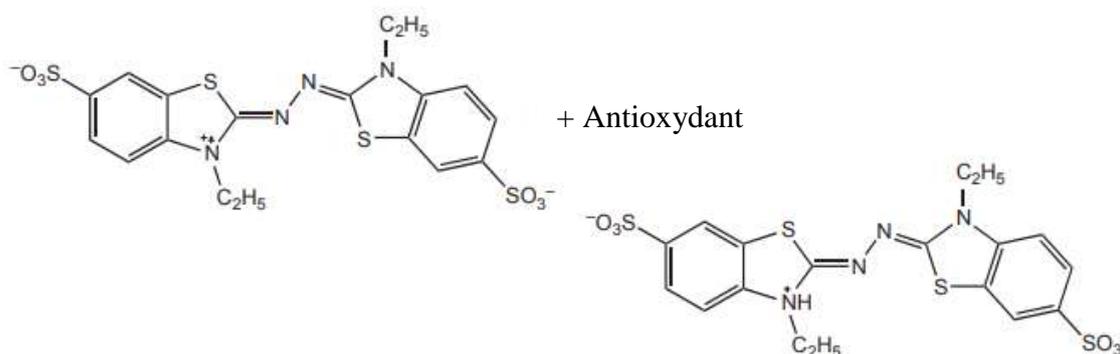


Figure 35. Réaction chimique ABTS^{•+} avec un composé antioxydant

(Hernández-Rodríguez et al., 2019).

✓ Mode opératoire

L'activité de piégeage du radical $ABTS^{*\cdot+}$ a été mesurée selon la méthode de Re et al (1999) avec de légères modifications.

Une solution mère $ABTS^{*\cdot+}$ est préparée en mélangeant 5 mL d'une solution méthanolique d' $ABTS^{*\cdot+}$ à 7 mM, et 5 mL de solution de persulfate d'ammonium à 2.45 mM. Le mélange réactionnel est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 16 h.

La solution fille d' $ABTS^{*\cdot+}$ est obtenue en diluant la solution mère avec du méthanol ou H_2O jusqu'à obtention d'une absorbance d'environ 0.700 ± 0.020 à 734 nm. Un volume de 40 μL d'extrait dilué ou de méthanol (blanc) est additionné à 160 μL de solution d' $ABTS^{*\cdot+}$. L'absorbance est mesurée à 734 nm après avoir incubé la réaction à l'obscurité pendant 10 min. BHA et BHT ont été utilisés comme standards.

Le pourcentage de piégeage des radicaux $ABTS^{*\cdot+}$ a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\%I = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

III.1.3 Test de réduction du cuivre (CUPRAC)

✓ Principe

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) a été développée par Apak et al. (2006), est basée sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ en présence de néocuproïne (NC) (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline) par l'action combinée de tous les antioxydants ou réducteurs en milieu hydro-éthanolique (pH 7.0), donnant un complexe $[Nc_2-Cu^+]$ avec un pic d'absorption maximal à 450 nm (Figure 36) (Özyürek et al., 2011).

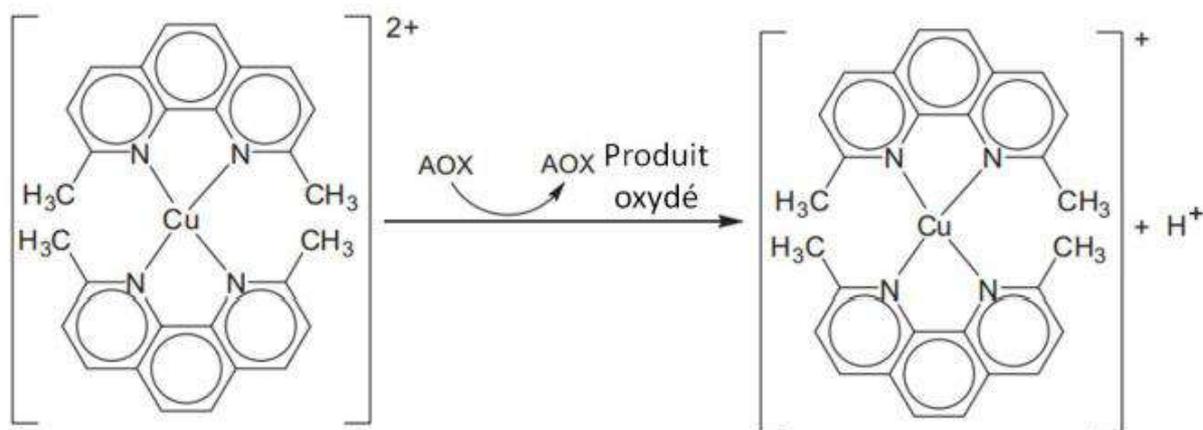


Figure 36. Mécanisme de réaction de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

✓ Mode opératoire

Trois solutions ont été préparées, une solution de chlorure de cuivre (II) à une concentration de 10^{-2} M (S1), un tampon d'acétate d'ammonium (NH_4Ac) à une concentration de (1M) à pH 7, et une solution de néocuproïne (Nc) à une concentration de (7.5 mM).

Dans une microplaque à 96 puits un volume de 40 μL d'extrait dilué à différentes concentration est additionné avec un mélange réactionnel contenant 60 μL d'acétate d'ammonium, 50 μL de néocuproïne, et 50 μL de chlorure de cuivre (CuCl_2).

Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière. Après 1 h d'incubation, l'absorbance est mesurée à 450 nm.

La capacité de réduction des extraits a été comparée à celle de du BHA et BHT. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

III.1.4 Piégeage du radical galvinoxyle (GOR)

✓ Principe

Le radicale galvinoxyle est un radical libre relativement stable comme le DPPH (Figure 37), de couleur jaune foncé, peut être réduit de manière irréversible en présence de molécules antioxydantes. En raison de son électron impair, le galvinoxyle présente une forte bande

d'absorption à 428 nm (dans l'éthanol), au fur et à mesure que l'électron est apparié, l'absorption s'annule et la couleur change du jaune foncé en jaune pâle (Shi H. et al., 2001).

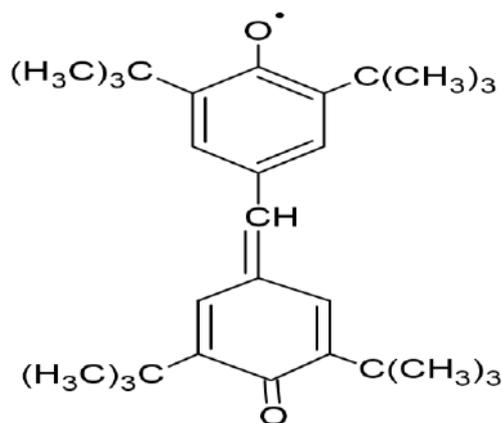


Figure 37. Structure chimique du radical galvinoxyle (Takebayashi et al., 2006).

✓ Mode opératoire

L'activité de piégeage du radical galvinoxyle est déterminée par la méthode décrite par Shi H et al., (2001).

Un volume de 160 μL de solution méthanolique de galvinoxyle (0,1 mM) a été ajouté à 40 μL d'extrait à différentes concentrations.

L'absorbance a été lue à 428 nm après une incubation de 2 h dans l'obscurité à température ambiante. BHA et BHT sont utilisés comme standard.

L'équation suivante a été utilisée pour calculer le balayage du radical galvinoxyle :

$$\%I = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

III.1.5 Test phénanthroline

✓ Principe

La méthode phénanthroline est une méthode colorimétrique basée sur la capacité du 1,10-phénanthroline de former un complexe avec le fer ferreux (Fe^{2+}) (ferroïne) suite à une

réaction d'oxydoréduction, induite par les molécules antioxydantes présentes dans l'extrait testé (Figure 38).

Le complexe octaédrique formé de couleur rouge intense est soluble et stable, et peut être mesuré en solution dans la plage de pH 2-9 et à une longueur d'onde de 510 nm (Adhikamsetty et al., 2008).

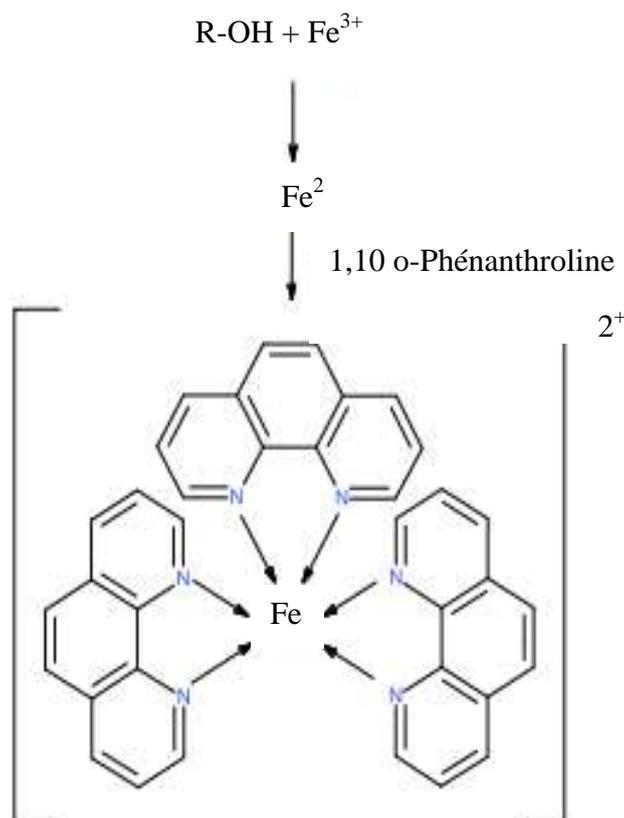


Figure 38. Réaction de réduction par la formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline (Hammad et al., 2017).

✓ Mode opératoire

L'activité phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydłowska-Czerniaka et al., (2008).

Le mélange réactionnel composé de 30 μ L d'o-phénanthroline (0,5% dans le méthanol), 50 μ L de $FeCl_3$ (0,2%), 110 μ L de méthanol, a été ajouté à 10 μ L d'extrait à différentes concentrations.

Le mélange a été agité puis incubé pendant 20 min à 30 °C. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standard. Les résultats ont été calculés à titre d' $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) correspondant à la concentration indiquant 0.50 d'absorbance.

III.2 Activité anticholinestérase

✓ Principe

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) des deux extraits ont été mesurées selon la méthode décrite par Ellman et al., (1961) avec une légère modification.

Le principe consiste de mettre en contact les extraits avec l'enzyme cholinestérase (AChE ou BChE) et son substrat acétylthiocholine ou butyrylthiocholine pour évaluer la capacité des extraits à inhiber l'activité de l'enzyme et à dégrader le substrat (Ali-Shtayeh et al., 2014) (Figure 39).

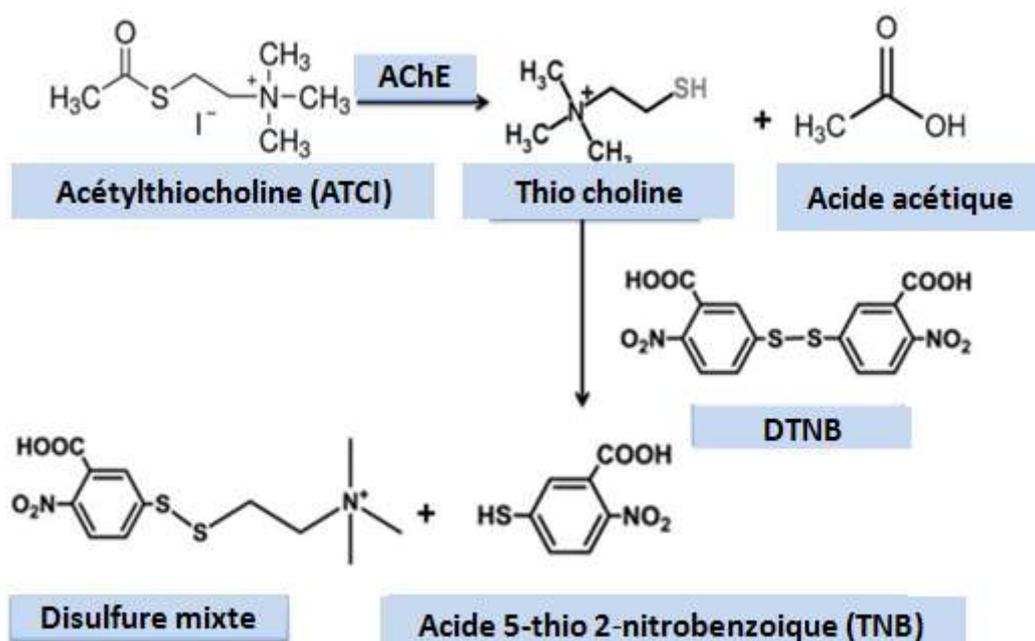


Figure 39. Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman (Ali-Shtayeh et al., 2014).

✓ Mode opératoire

Un volume de 10 μL d'une solution d'extrait dissoute dans l'éthanol à différentes concentrations a été transféré dans une microplaque à 96 puits avec 150 μL de tampon phosphate de sodium (100 Mm, pH 8.0) et un volume de 20 μL d'AChE de l'anguille électrique ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE du sérum de cheval ($6,85 \times 10^{-3}$ U). Les microplaques ont ensuite été incubées pendant 15 min à 25 °C puis 10 μL de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. La réaction a été ensuite initiée par l'ajout de substrat de l'enzyme, 20 μL d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM).

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 412 nm. La galantamine a été utilisée comme référence.

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme AChE ou BChE est déterminé par rapport au blanc par la formule suivante : $[(E - S)/E] \times 100$.

E : l'activité de l'enzyme sans extrait

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

IV. Activité anticancéreuse

IV.1 Préparation des échantillons

Les extraits AcOEt séchés des deux plantes (EAELN et EAELT) et les fractions VLC de l'EBLN ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich) suivi d'un milieu RPMI, car les extraits ne sont pas soluble dans le milieu de culture, la teneur de DMSO dans la solution ne dépasse pas 0.1%.

Le mélange a ensuite été centrifugé pour éliminer les ingrédients insolubles et le surnageant a été passé à travers des filtres de stérilisation. La solution a été diluée avec du milieu RPMI et préparée à différentes concentrations.

IV.2 Culture de cellules

➤ MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 est une lignée de cellules épithéliales humaines de cancer du sein triple négatif, ER⁻, PR⁻ et HER2⁻, isolée à partir d'un épanchement pleural d'une patiente de

51 ans de type caucasien, atteinte d'un adénocarcinome mammaire fortement agressif et hautement métastatique.

Ces cellules sont adhérentes de morphologie épithéliale, elles ont une forme de fuseau. Elles se développent en monocouche (Figure 40). MDA-MB-231 est l'une des cellules de cancer du sein triple négatif les plus couramment utilisées dans les recherches sur le cancer et l'immuno-oncologie (ATCC).

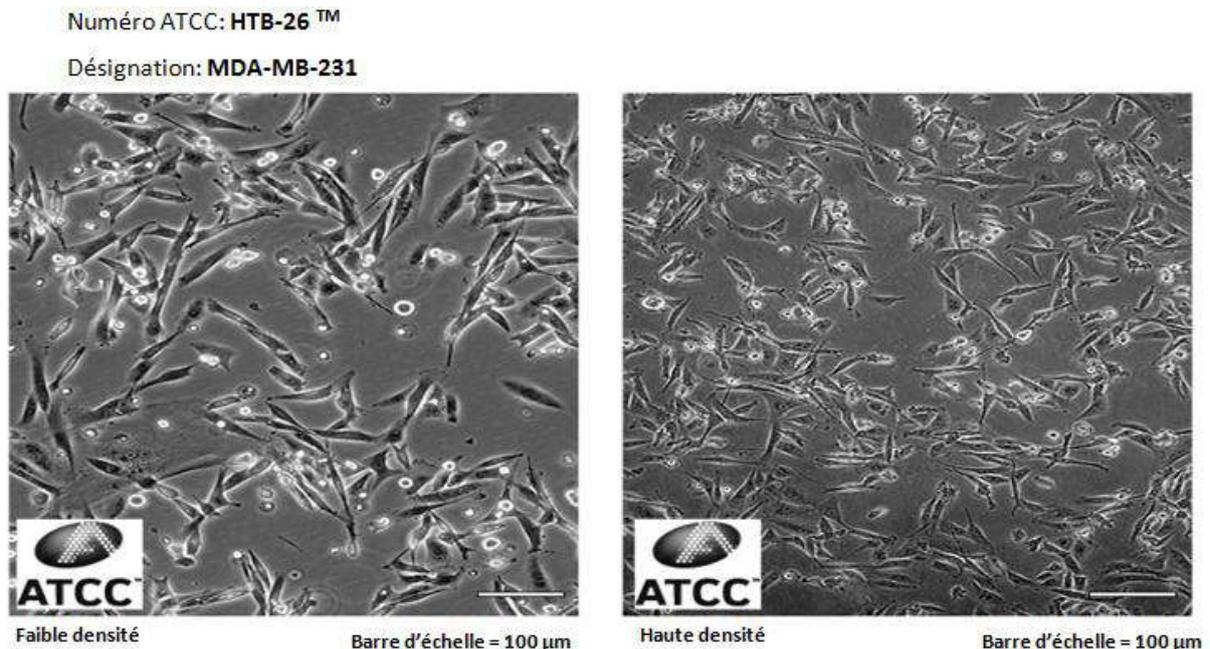


Figure 40. Clichés de cellules MDA-MB-231 observées par microscopie optique en contraste de phase (ATCC).

➤ PC3

La lignée PC3 a été établie à partir d'une métastase osseuse au niveau d'une vertèbre lombaire d'un homme âgé de 62 ans de type caucasien atteint d'un adénocarcinome prostatique de stade IV (Kaighn et al., 1979). Cette lignée est hormonorésistante, n'exprime pas les récepteurs aux androgènes (RA) et PSA (prostate-specific antigen) (Tai et al., 2011), mais montrent une expression élevée de facteur de croissance TGF- α et des récepteurs de l'EGF (epidermal growth factor receptor), et possède un haut pouvoir tumorigène.

Les cellules cultivées présentent une croissance adhérente en monocouche et une morphologie épithéliale (ATCC) (Figure 41).

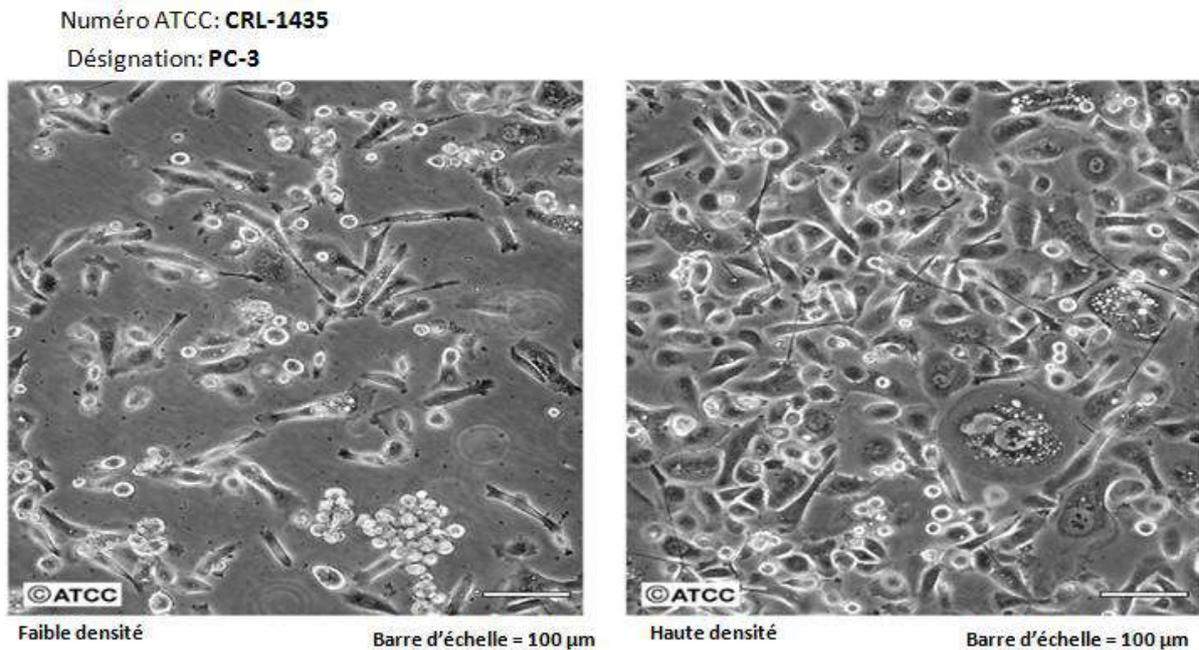


Figure 41. Clichés de cellules PC3 observées par microscopie optique en contraste de phase (ATCC).

✓ Protocole

Les cellules MDA-MB-231, dérivées d'un épanchement pleural d'adénocarcinome du sein, provenant de l'ATCC ont été cultivées dans du DMEM (PAN Biotech; Aidenbach, Allemagne) additionné de 10 % de sérum bovin foetal (FBS ; Dominique Dutscher, SA; Brumath, France) et 1 % pénicilline/streptomycine. La lignée de cancer de la prostate PC3 de l'ATCC a été cultivée en utilisant du milieu RPMI 1640 (PAN Biotech; Aidenbach, Allemagne) additionné de 10 % de FBS et de 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont cultivées en flasques à bouchon filtrant, 75 cm² dans 15 mL de milieu de culture et cultivées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours afin que les nutriments du milieu ne deviennent pas limitant pour le bon développement des cellules.

La trypsine-EDTA est utilisée pour décrocher les cellules de leur support afin de procéder aux différentes expérimentations ou pour réaliser les repiquages. Après récupération des cellules, la concentration cellulaire est déterminée par un comptage à l'aide d'une cellule de Mallassez.

Toutes les expériences sont réalisées avec des cultures n'excédant pas 30 repiquages.

IV.3 Test MTT

L'activité antiproliférative de l'EAELN, l'EAELT et les fractions VLC de l'EBLN contre les deux lignées cellulaires PC3 et MDA-MB-231 a été évaluée par le test MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium ; Sigma-Aldrich), selon Mossman (1983).

✓ Principe

Ce test donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Il est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel de tétrazolium, de couleur jaune, en cristaux de formazan, de couleur violette, par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes (Figure 42).

Le nombre de cellules vivantes après 72 h d'incubation en présence ou non des extraits à tester est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée quantitativement par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm.

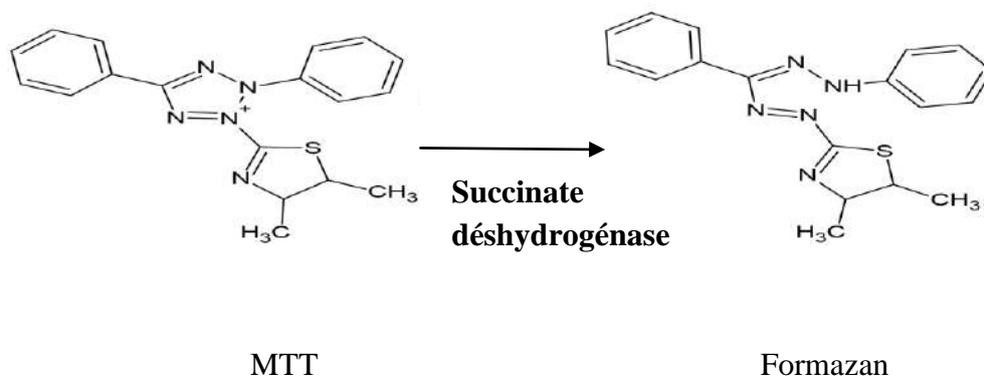


Figure 42. Transformation de MTT en formazan par la succinate déshydrogénase.

✓ Protocole

Les lignées PC3 et MDA-MB-231 (5000 cellules/puits) ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits et incubées avec différentes concentrations (0-1000 µg/mL) pour l'EAELN et l'EAELT et (65.5, 125, et 250 µg/mL) pour les fractions VLC de l'EBLN (F1-F6) pendant

72h dans un incubateur (Hera cell, ThermoFisher scientific) à 37°C dans une atmosphère saturée en eau contenant 5 % de CO₂. Les cellules sans traitement ont été utilisées comme témoins. Après 72 h d'exposition aux extraits, les puits ont été vidés, lavés au PBS puis 100 µL de MTT (5 mg/mL) ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 2 heures supplémentaires à 37°C et 5% de CO₂. Après cela, le milieu a été soigneusement aspiré et les cristaux de formazan formés ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma-Aldrich). L'absorbance dans chaque puits a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Varioskan LUX, Thermo Scientific) couplé à un ordinateur. Les absorbances obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes.

Chaque condition expérimentale a été analysée en triplicata.

Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$x = \frac{A_{570} \text{ (cellules traitées)}}{A_{570} \text{ (contrôle négative)}} \times 100$$

A₅₇₀ : Absorbance mesurée à 570 nm des cellules traitées avec l'EAELN et l'EAELT et par les fractions VLC de l'EBLN

A₅₇₀ : Absorbance mesurée à 570 nm des cellules en absence d'extraits

L'IC₅₀ a été calculée en tant que concentration en extrait qui inhibe la croissance de 50 % des cellules par rapport aux cellules témoins non traitées.

IV.4 Test d'apoptose

✓ Principe

La perte de la symétrie des phosphatidylsérines (PS) dans la membrane plasmique est l'une des premières caractéristiques des cellules apoptotiques (Fadok et al., 1993 ; Fadok et al., 1992 ; Del Bino et al., 1999), au début de l'apoptose les phosphatidylsérines transloquent de feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique se qui abouti à une perte d'asymétrie de la membrane. L'annexine V se lie aux phospholipides chargés négativement (Figure 43), comme la PS, cette liaison permet de détecter la phase précoce d'apoptose (Tait et al., 1989;

Kooperman et al., 1994). L'annexine V marquée par FITC liée aux phosphatidylsérines est dosée par cytométrie en flux. L'iodure de propidium (IP) ou la 7-Amino-Actinomycine (7-AAD) sont largement utilisés en conjonction avec l'annexine V, permet de détecter l'intégralité de la membrane plasmique, il est utilisé pour détecter les cellules apoptotiques tardives ou nécrotiques (Vermes et al., 2000).

La pénétration du IP dans les cellules dépend de la membrane plasmique, seule les cellules mortes dont la membrane est endommagée seront perméable au IP, les celles viables avec une membrane intacte excluent l'IP (Vermes et al., 2000; Darzynkiewicz et al., 1992).

Les données générées par le cytomètre en flux peuvent être tracées dans des tracés de points bidimensionnels, dans lesquels IP représenté par rapport à l'annexine V-FICT (Figure 43).

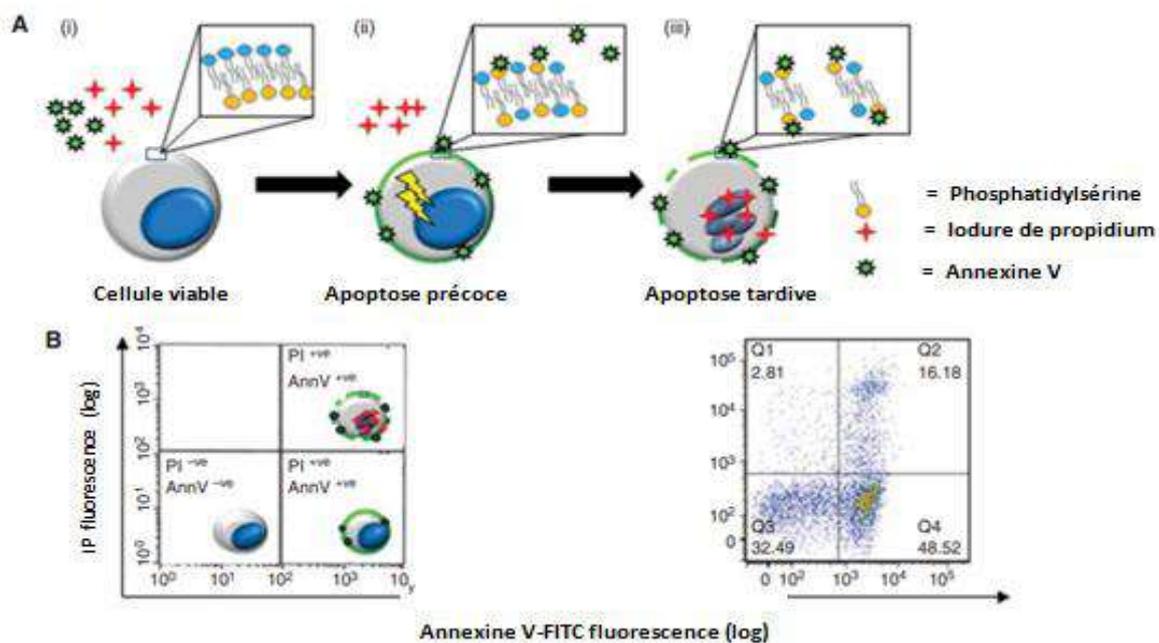


Figure 43. Détection de l'apoptose par coloration à l'annexine V-FITC et au iodure de propidium (IP) (Crowley et al., 2016).

✓ Protocole

L'apoptose cellulaire induite par l'EAELN, l'EAELT et par les fractions F1 et F6 de l'EBLN ont été détectées par coloration à l'annexine V-FITC/IP conformément aux instructions du fabricant (BD Pharmingen TM FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I). Les cellules PC3 (10^5 cellules/puits) ont été traitées avec différentes concentrations (250, 500, et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour l'EAELN et l'EAELT et (65.5, 125, and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour les fractions F1 et F6 pendant 24 h après ensemencement dans des plaques à 96 puits. Les cellules ont ensuite été lavées avec du tampon PBS froid, centrifugées puis reprises dans un tampon de liaison 1X à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. 100 μL de la solution (1×10^5 cellules) ont été transférés dans des tubes de culture de 5 mL et colorés avec 5 μL d'annexine V et 5 μL d'IP. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante (25 °C) dans l'obscurité, 400 μL de tampon de liaison ont été ajoutés.

Les cellules colorées ont été déterminées en utilisant la cytométrie en flux Accuri TM-C6 (BD-Biosciences).

IV.5 Analyse du cycle cellulaire

✓ Principe

L'analyse de distribution du cycle cellulaire est un outil important en biologie cellulaire, souvent utilisée dans les études cliniques pour obtenir des informations sur la distribution des cellules dans les tumeurs ou d'autres troubles prolifératifs. Le contenu en ADN cellulaire double pendant la phase S et donc les cellules en G2/M ont deux fois plus d'ADN que les cellules en phase G1, les cellules en phase S ont une teneur intermédiaire. L'analyse par cytométrie en flux en utilisant le tampon de coloration IP/RNase peut fournir des informations quantitatives sur la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S, et G2/M) et la ploïdie de l'ADN. L'IP est un agent intercalant des acides nucléiques et un colorant fluorescent qui colore à la fois l'ADN et l'ARN en utilisant la cytométrie en flux, donc il est crucial que l'ARN soit éliminé des cellules par digestion avec des ribonucléases (RNase) pour obtenir une mesure précise de la teneur en ADN. Les cellules doivent être fixées et perméabilisées par l'éthanol froid pour permettre à l'IP de traverser facilement la membrane plasmique pour colorer l'ADN. IP est détecté dans la gamme orange

du spectre à l'aide d'un filtre passe-bande 562-588 nm. La fluorescence des cellules marquées par l'IP est proportionnelle à leur contenu en ADN.

Les résultats des mesures de fluorescence par cytométrie en flux sont affichés sous forme d'histogrammes de fréquence de teneur en ADN cellulaire. Les histogrammes montrent les proportions de cellules dans les phases respectives du cycle cellulaire en fonction des différences d'intensité de fluorescence. Ils se caractérisent par la présence de deux pics, le premier pic le plus grand représente les cellules en phases G0/G1 (2n), et le deuxième pic les cellules en phase G2/M (4n) (Figure 44), l'intensité de fluorescence de deuxième pic est deux fois supérieure à celle de premier pic, la surface entre les deux pics représente les cellules en phase S (Krueger & Wilson, 2011).

Les cellules traitées avec un agent qui perturbe la progression du cycle cellulaire montrent une accumulation accrue des cellules dans la phase où la progression du cycle cellulaire a été affectée (Darzynkiewicz et al., 2001).

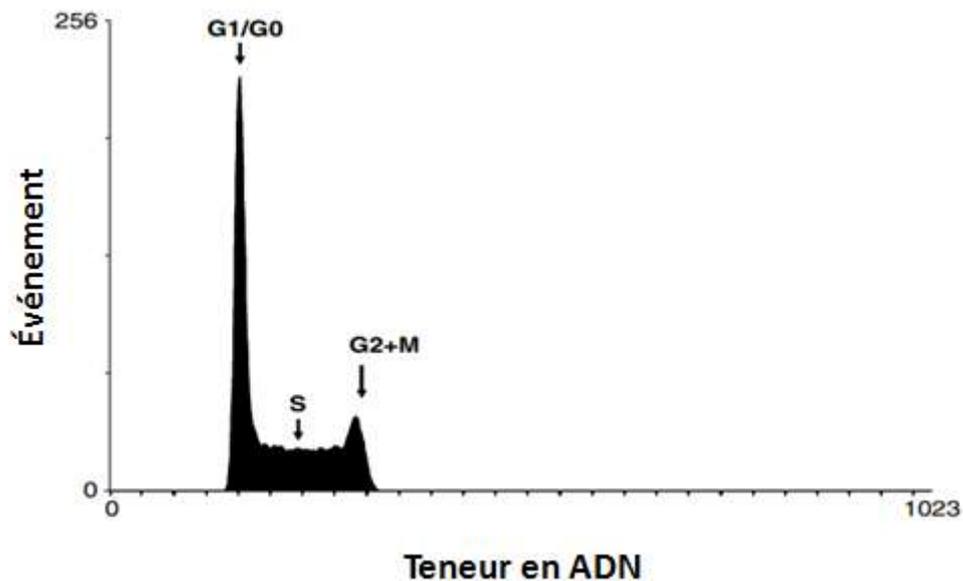


Figure 44. Histogramme d'ADN obtenu par cytométrie en flux après marquage par IP (Krueger & Wilson, 2011).

✓ Protocol

Le cycle cellulaire a été déterminé à l'aide d'un kit de détection du cycle cellulaire (BD Pharmingen TM PI/RNase Staining Buffer).

Les cellules PC3 (10^6 cellules/puits) ont été traitées avec l'EAELN et l'EAELT après ensemencement dans des plaques de 6 puits avec différentes concentrations (250, 500, et 1000 $\mu\text{g/mL}$) pendant 24 h. À la fin du traitement, les cellules ont été collectées et lavées avec du PBS froid et centrifugées à 1000 tr/min, le culot a été fixé dans l'éthanol froid à 70 % ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) pendant 2 h. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS froid et centrifugées pendant 10 min à 1000-1500 tr/min pour éliminer l'éthanol, 10^6 cellules ont été remises en suspension avec 0,5 mL d'un mélange contenant de l'iodure de propidium et de la RNase. Après 15 min d'incubation à température ambiante, le contenu en ADN des cellules a été quantifié à l'aide d'un cytomètre en flux Accuri TM-C6 (BD-Biosciences).

V. LC-ESI-DDA-HRMS/MS

V.1 Préparation des échantillons

L'EAELN, l'EAELT, et les fractions VLC F1 et F6 de l'EBLN ont été solubilisés dans du MeOH à une concentration de 10 mg/mL avant l'analyse avec le système LC-ESI-DDA-HRMS/MS.

V.2 L'acquisition des données

Les spectres LC-ESI-DDA-HRMS/MS ont été obtenus en utilisant un système de chromatographie liquide (HPLC) Dionex Ultimate 3000 équipé d'une pompe Ultimate 3000 RS couplée à un système Thermo Instruments MS (LTQ Orbitrap XL).

Le système HPLC a été exécuté en utilisant une colonne Water BEH C18 (1.7 μm , 2.1 mm x 150 mm). Le solvant A était 0.1 % d'acide formique H_2O , le solvant B était 0.1 % d'acide formique ACN. Le gradient utilisé était de 5% B pendant 5 min, 5-100% pendant 20 min, 100% pendant 7 min. Le débit utilisé était de 0.150 mL/min, la température de la colonne était de $45\text{ }^\circ\text{C}$.

Le volume d'injection était de 5 μL .

En mode ion positif, les conditions MS utilisées étaient les suivantes : tension capillaire, 35 V ; température capillaire, 275 °C ; débit de gaz auxiliaire, 15 unités arbitraires ; débit de gaz gaine, 20 unités arbitraires ; tension de pulvérisation, 3.5 kV ; gamme de masse, 220–1600 m/z ; résolution FT, 30 000. En mode ions négatifs, les conditions MS utilisées étaient les suivantes : tension capillaire, -35 V ; température capillaire, 275 °C ; débit de gaz auxiliaire, 15 unités arbitraires ; débit de gaz gaine, 20 unités arbitraires ; tension de pulvérisation, 3.5 kV ; gamme de masse, 220–1600 m/z ; résolution FT, 30 000. Les spectres MS2 dépendant des données pour l'ion le plus intense par balayage ont été acquis à une résolution FT de 7500, en utilisant la dissociation induite par collision (CID) avec une énergie de collision normalisée de 35%, un Q d'activation de 0.25 ms, et temps d'activation de 30 ms.

Tous les instruments ont été contrôlés par le système de données Xcalibur, et l'acquisition des données a été effectuée par le logiciel d'analyse Xcalibur (version 2.1) (Waltham, MA, USA) de Thermo Electron Corp.

V.3 Paramètres de prétraitement des données

Les fichiers de données brutes ont été convertis en fichier mzXML open source universel avec MSConvert 3.0 et ont ensuite été traités à l'aide du logiciel MZmine 2.53.

Les spectres MS et MS/MS ont été extraits à l'aide de MZmine 2.53 avec un niveau de bruit de détection de masse fixé à $2E4$ et $2E3$, respectivement en mode ion positif et négatif.

Les chromatogrammes ont ensuite été construits avec les algorithmes ADAP [60] en utilisant une taille de groupe minimale de 4 scans, un seuil d'intensité de groupe de 5000 et une tolérance m/z de 0.01 Da (environ 20 ppm).

L'algorithme de déconvolution du chromatogramme d'ondelettes ADAP a été utilisé avec les paramètres suivants : rapport signal/bruit=10, rapport coefficient/surface=0, plage de durée de pic=0.2–3 min, plage d'ondelettes de temps de rétention (TR)=0.02–0.5, plage m/z pour l'appariement de balayage MS/MS de 0,02 et plage TR pour l'appariement de balayage MS/MS de 0.5 min. Les chromatogrammes ont été désisotopés à l'aide de l'algorithme du groupeur de pics isotopiques avec une tolérance m/z fixée à 0.001 (m/z<500) et 5 ppm (m/z>500), et une tolérance TR de 0,1 min.

L'alignement des pics a été réalisé en utilisant la méthode join aligner en utilisant les paramètres suivants : tolérance m/z à 0.005 ($m/z < 500$) et 10 ppm ($m/z > 500$) et une tolérance TR absolue 0.2 min.

Chaque scan MS/MS a été associé aux scans MS correspondants en utilisant une tolérance TR de 0,5 min et une tolérance m/z de 0.02 ($m/z < 500$) et 20 ppm ($m/z > 500$).

La liste des pics a finalement été remplie à l'aide du module dit « même remplissage d'intervalle de plage TR et m/z » avec une tolérance m/z de 0,005 ($m/z < 500$) et 7 ppm ($m/z > 500$).

V.4 Identification des métabolites

Les métabolites ont été identifiés grâce à la bibliothèque GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking). Les enquêtes sur les spectres de la bibliothèque ont été effectuées en utilisant les valeurs des paramètres comme suit : tolérance de masse de l'ion parent = 0,02 Da, tolérance de masse de l'ion fragment = 0.02, pics appariés minimum = 4, paires minimum Cos > 0.50.

VI. Analyses statistiques

Les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM (version 8.0.2). Toutes les expériences ont été réalisées en triple exemplaire. L'ANOVA unidirectionnelle et bidirectionnelle avec des comparaisons *post-hoc* de Bonferroni ont été utilisées comme indiqué dans les légendes. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SD. Les différences significatives ont été fixées à une valeur $p < 0.05$.

Partie III

Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Rendements d'extraction

Le fractionnement de l'extrait hydroéthanolique de chaque espèce *Linum*, par extraction liquide/liquide a permis d'obtenir quatre extraits respectifs pour la plante *L. tryginum* (EEPLT, ECLT, EAELT et EBLT) et quatre extraits respectifs pour la plante *L. numidicum* (EEPLN, ECLN, EAELN et EBLN). Les extraits *n*-BuOH des deux plantes représentent le rendement le plus élevé, suivis de ceux de l'AcOEt, alors que les extraits CHCl₃ et EP ont les rendements les plus faibles (Tableau 6).

Tableau 6. Rendement d'extraction de *L. numidicum* et *L. trigynum*

Extrait	<i>Linum numidicum</i>		<i>Linum trigynum</i>	
	Poids (g)	Rendement (%)	Poids (g)	Rendement (%)
EP	2	0.22	3.19	0.35
CHCl ₃	0.74	0.08	1.65	0.18
AcOEt	2.22	0.25	2.98	0.33
<i>n</i> -BuOH	12.19	1.35	7.9	0.87

I.2 Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux de l'EAELN et l'EAELT

Les teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes des deux extraits ont été déterminées à l'aide de méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium.

Le tableau 7 montre que l'EAELN est plus riche en polyphénols ($336,05 \pm 4.37 \mu\text{g GAE/mL}$) et flavonoïdes ($183.75 \pm 1.17 \mu\text{g GAE/ml}$) par rapport à l'EAELT.

Tableau 7. Teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes de l'EAELN et l'EAELT

Extraits	Teneur totale en composés phénoliques ($\mu\text{g GAE/mL}$)	Teneur en flavonoïdes ($\mu\text{g QE/mL}$)
EAELN	336.05 ± 4.37^b	183.75 ± 1.17^b
EAELT	90.03 ± 0.62^a	18.33 ± 1.47^a

Les composés phénoliques totaux ont été exprimés en μg équivalent d'acide gallique/mL ($\mu\text{g GAE/mL}$) et les teneurs en flavonoïdes en μg équivalent de quercétine/mL ($\mu\text{g QE/mL}$). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD ($n = 3$). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0.05$).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*.

I.3 Activité antioxydante de l'EAELN et l'EAELT

L'activité antioxydante de l'EAELN et l'EAELT a été testée selon cinq méthodes : DPPH, ABTS, CUPRAC, phénanthroline, et piégeage des radicaux galvinoxyles.

I.3.1 Piégeage du radical libre DPPH•

La Figure 45 montre les résultats de l'activité antiradicalaire DPPH de l'EAELN et l'EAELT. Les résultats sont représentés par les pourcentages d'inhibition du DPPH pour chaque concentration d'extrait, les valeurs de concentration inhibitrice semi-maximale (IC_{50}) sont consignées dans le Tableau 8.

L'EAELN et l'EAELT présentent une activité antioxydante, l'EAELN a montré une meilleure activité antiradicalaire ($\text{IC}_{50} = 11.10 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$), en comparaison avec l'EAELT ($\text{IC}_{50} = 101.31 \pm 0.63 \mu\text{g/mL}$).

L'activité inhibitrice de l'EAELN est plus forte que celle du BHT ($\text{IC}_{50} = 22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$), mais moins faible que celle du BHA ($\text{IC}_{50} = 5.73 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$) utilisés comme standard (Tableau 8).

Tableau 8. Valeurs IC₅₀ (µg/mL) d'inhibition du DPPH•

Extraits	CI ₅₀ (µg/mL)
EAELN	11.10 ± 0.01 ^b
EAELT	101.31 ± 0.63 ^d
BHT	22.32 ± 1.19 ^c
BHA	5.73 ± 0.41 ^a

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SD (n = 3). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes (p < 0.05).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*; BHA, ButylHydroxyAnisole; BHT, ButylHydroxyToluene.

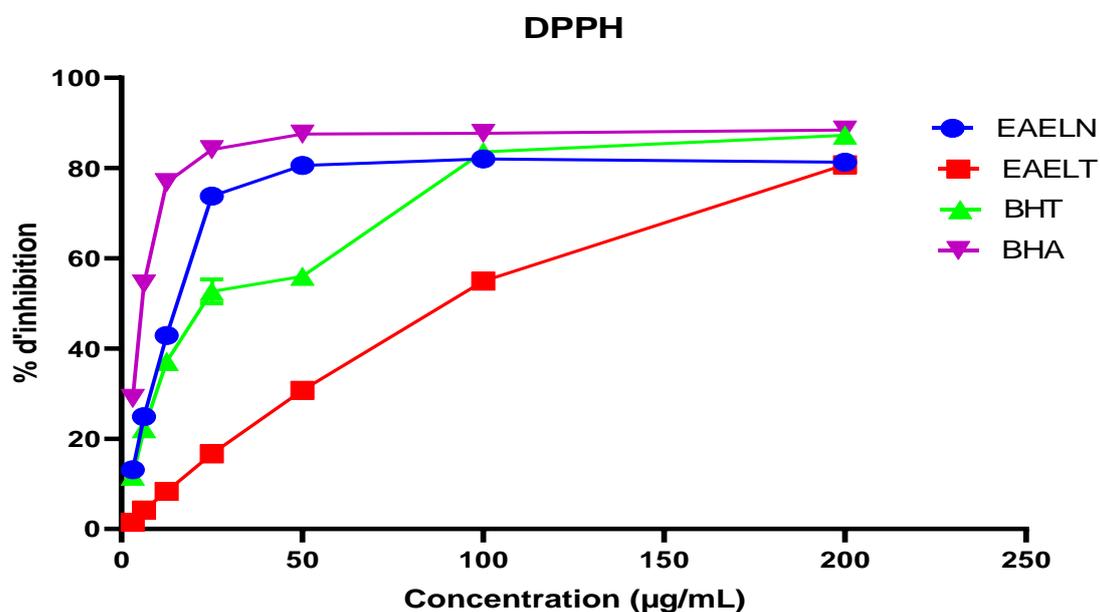


Figure 45. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.

I.3.2 Piégeage du radical libre ABTS •+

Les résultats de l'activité inhibitrice du radical ABTS•+ de l'EAELN et l'EAELT sont présentés dans la figure 46 et le tableau 9.

Les résultats obtenus montrent que l'EAELN et l'EAELT piègent le radical ABTS •+.

L'EAELN est plus actif vis-à-vis du radical ABTS•+ ($IC_{50} = 8.28 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) par rapport à l'extrait EAELT ($IC_{50} = 37.56 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$). L'activité inhibitrice de BHT et BHA s'est avérée plus forte que celle de l'EAELN. ($IC_{50} = 1.29 \pm 0.30$ et 1.81 ± 0.10 , respectivement).

Tableau 9. Valeurs IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) d'inhibition d'ABTS•+

Extraits	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EAELN	8.28 ± 0.12^b
EAELT	37.56 ± 0.41^c
BHT	1.29 ± 0.30^a
BHA	1.81 ± 0.10^a

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD ($n = 3$). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0.05$).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*; BHA, ButylHydroxyAnisole; BHT, ButylHydroxyToluene.

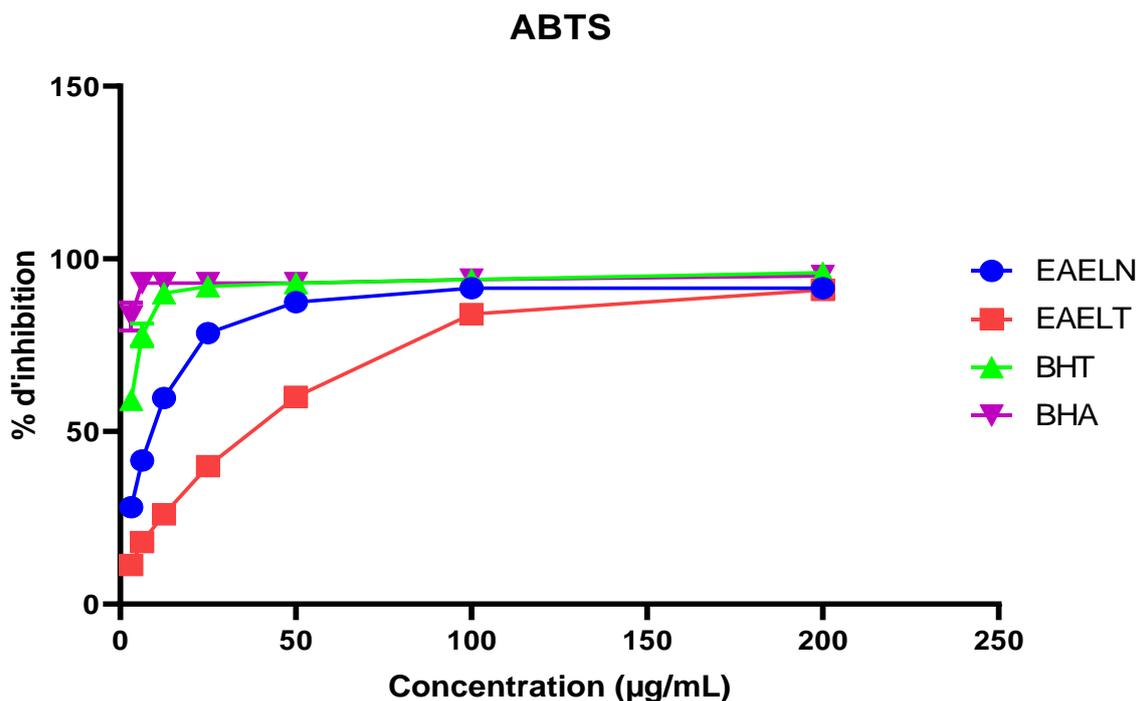


Figure 46. Pourcentages d’inhibition du radical libres ABTS •+ en fonction des différentes concentrations de l’EAELN et l’EAELT.

I.3.3 Test de réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats de l’activité CUPRAC de l’EAELN et l’EAELT sont représentés par les absorbances de chaque concentration d’extrait. Les valeurs d’ $A_{0.50}$ exprimées en $\mu\text{g/mL}$ représentent la concentration de l’extrait à l’absorbance 0.5.

D’après les résultats, l’activité réductrice du cuivre exercée par l’EAELN et l’EAELT augmente avec l’augmentation de la concentration (Figure 47).

L’EAELN a montré une meilleure activité réductrice du cuivre ($A_{0.50} = 23.45 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$) par rapport à l’EAELT ($A_{0.50} = 39.33 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$). La concentration de l’EAELN à l’absorbance 0.5 est deux fois celle du BHT et 6 fois celle du BHA (Tableau 10).

Tableau 10. Valeurs $A_{0.50}$ de réduction cuprique

Extraits	$A_{0.50}$
EAELN	23.45 ± 0.08^c
EAELT	39.33 ± 0.28^d
BHT	9.62 ± 0.87^b
BHA	3.64 ± 0.19^a

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD (n = 3). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0.05$).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*; BHA, ButylHydroxyAnisole; BHT, ButylHydroxyToluene.

$A_{0.50}$: la concentration à l'absorbance 0.5.

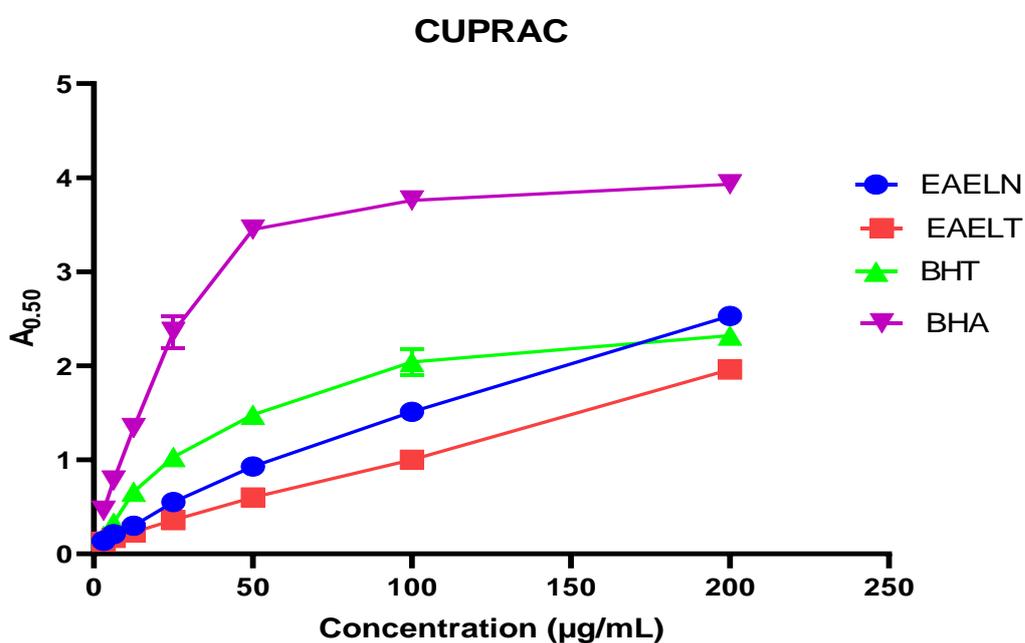


Figure 47. Absorbance CUPRAC en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.

I.3.4 Piégeage du radical galvinoxyle (GOR)

Les résultats de piégeage du radical GOR par l'EAELN et l'EAELT sont présentés dans la figure 48.

Les résultats ont montré que l'EAELN a présenté la meilleure activité inhibitrice ($IC_{50} = 10.40 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$).

L'activité manifestée par l'EAELN est modérément faible par rapport à celle du BHT et BHA ($IC_{50} = 3.32 \pm 0,18$ et $5.38 \pm 0,06$, respectivement) (Tableau 11).

Tableau 11. Valeurs IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de piégeage des GOR

Extraits	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$
EAELN	10.40 ± 0.05^c
EAELT	56.22 ± 0.48^d
BHT	$3.32 \pm 0,18^a$
BHA	$5.38 \pm 0,06^b$

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD ($n = 3$). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0.05$).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*; BHA, ButylHydroxyAnisole; BHT, ButylHydroxyToluene.

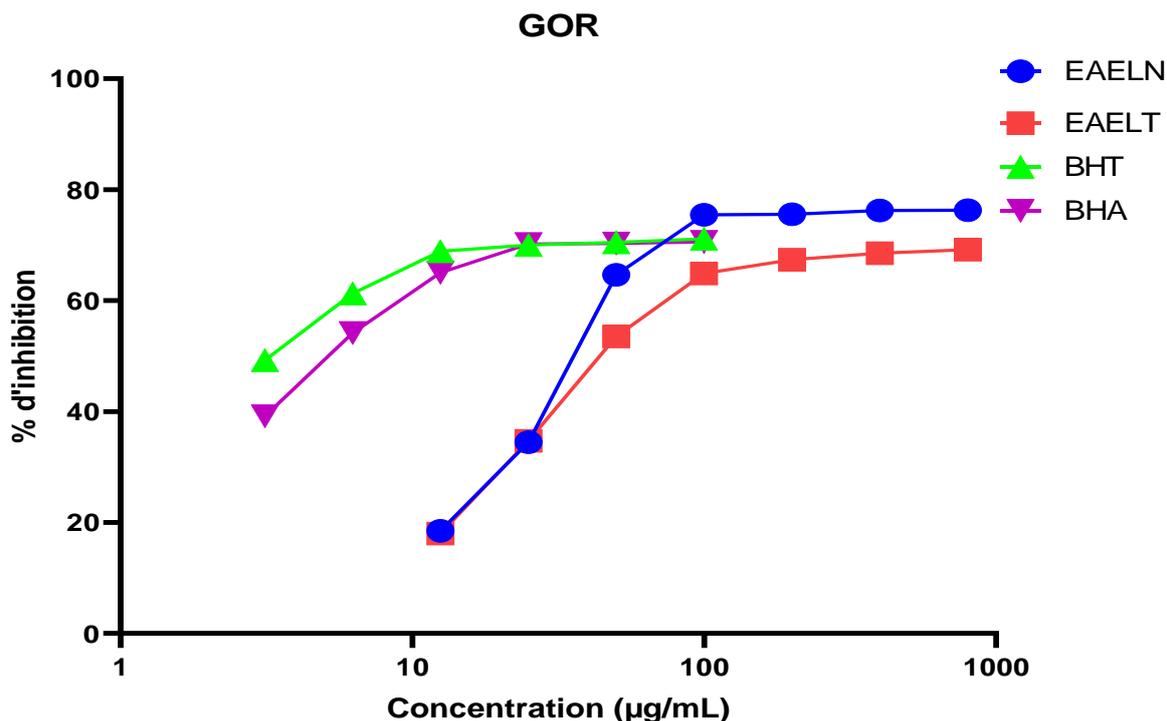


Figure 48. Pourcentages d'inhibition du radical galvinoxyle en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.

I.3.5 Test phénanthroline

Les résultats de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} phénanthroline par l'EAELN et l'EAELT à différentes concentration sont présentés dans la figure 49.

L'EAELN et l'EAELT ont montré des résultats comparables avec $A_{0,50}$ de 13.97 ± 1.44 et 16.73 ± 1.60 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, tandis qu'ils ont montré un effet modérément faible par rapport au BHA ($A_{0,5} = 0.93 \pm 0.07$ $\mu\text{g/mL}$) et au BHT ($A_{0,5} = 2.24 \pm 0.17$ $\mu\text{g/mL}$) (Tableau 12).

Tableau 12. Valeurs $A_{0.50}$ du complexe Fe²⁺-phénanthroline

Extraits	$A_{0.50}$
EAELN	13.97 ± 1.44^d
EAELT	16.73 ± 1.60^d
BHT	2.24 ± 0.17^a
BHA	0.93 ± 0.07^a

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD (n = 3). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0.05$).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*; BHA, ButylHydroxyAnisole; BHT, ButylHydroxyToluene.

$A_{0.50}$: la concentration à l'absorbance 0.5.

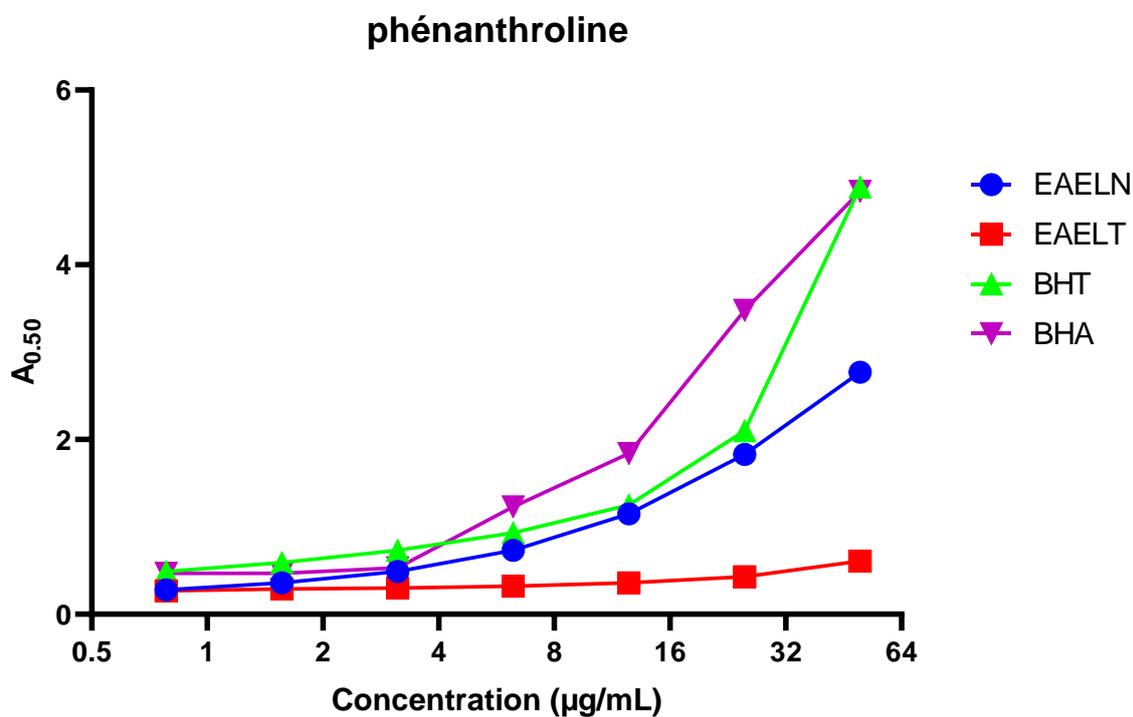


Figure 49. Absorbance du complexe Fe²⁺-phénanthroline en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.

I.4 Activité anticholinestérase

L'activité anticholinestérase de l'EAELN et l'EAELT a été mesurée par l'utilisation de deux cholinestérases (AChE et BChE). Les résultats sont représentés par les pourcentages d'inhibition de l'AChE et de la BChE pour chaque concentration d'extrait (Figure 50 et 51), les valeurs d'IC₅₀ sont regroupées dans le tableau 13.

Les résultats ont montré que la potentielle anti-AChE de l'EAELN (IC₅₀ = 109.28 ± 1.05 µg/mL) est supérieur à celui de l'EAELT (IC₅₀ = 129.42 ± 1.90 µg/mL) mais ce potentiel est faible par rapport à celui de standard galantamine (IC₅₀ = 6.27 ± 1.16). Tandis que une faible activité inhibitrice de la BChE est observée après traitement avec l'EAELN et l'EAELT (IC₅₀ >200) en comparaison avec la galantamine (IC₅₀ = 34.75 ± 1.99).

Tableau 13. Valeurs IC₅₀ d'inhibition de l'AChE et BChE

Extraits	IC ₅₀ µg/mL	
	AChE	BChE
EAELN	109.28 ± 1.05 ^b	> 200
EAELT	129.42 ± 1.90 ^c	> 200
Galantamine	6.27 ± 1.16 ^a	34.75 ± 1.99

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SD (n = 3). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes (p < 0.05).

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *Linum numidicum*; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *Linum trigynum*.

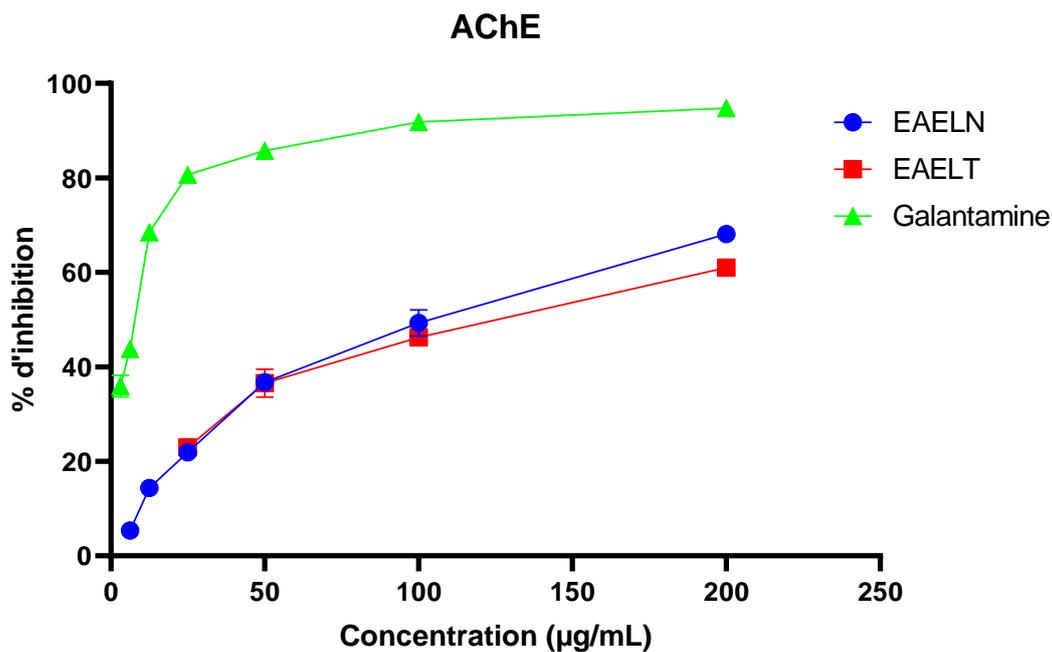


Figure 50. Pourcentages d'inhibition de l'AChE en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.

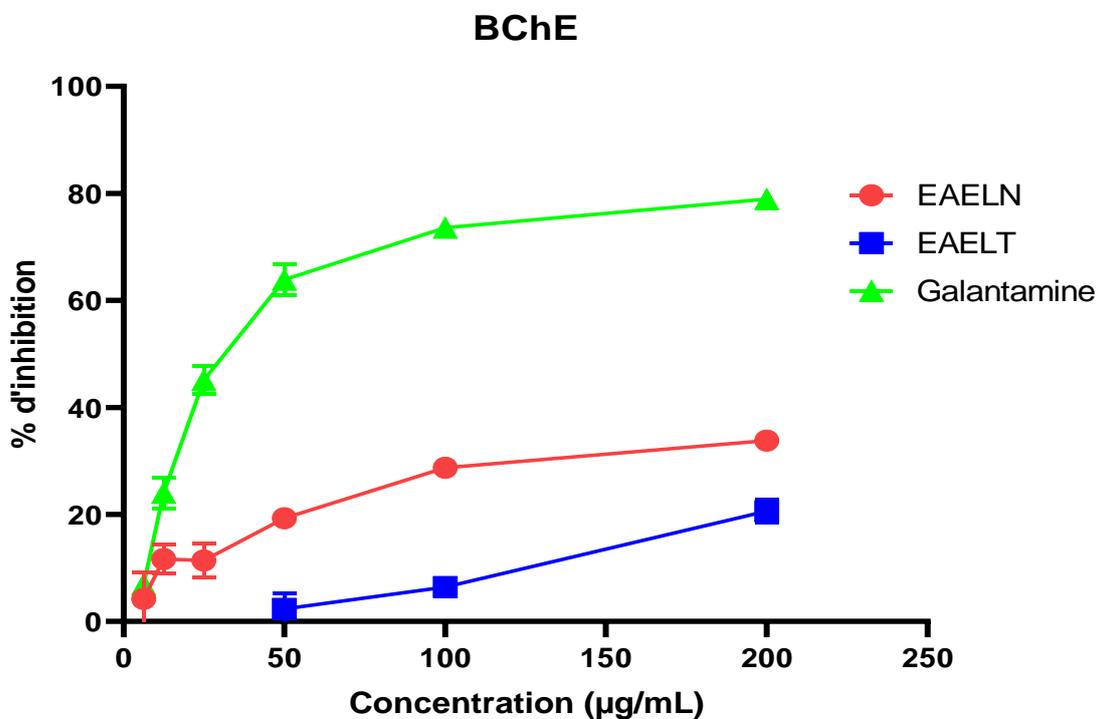


Figure 51. Pourcentages d'inhibition de la BChE en fonction des différentes concentrations de l'EAELN et l'EAELT.

I.5 Activité anticancéreuse

Détermination de la capacité de l'EAELN et l'EAELT, et des fractions VLC (F1-F6) de l'EBLN à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (PC3) et du sein humain (MDA-MB-231), bloquer le cycle cellulaire et induire l'apoptose dans les cellules PC3 où elle est connue pour être la voie la plus prometteuse pour traiter le cancer.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) 2020, les incidences les plus élevées au monde selon le sexe sont observées pour les cancers du sein et de la prostate. Nous avons donc décidé, comme preuve de concept, de tester l'effet de nos extraits sur des lignées cellulaires de cancer du sein (MDA-MB-231) et de la prostate (PC3).

I.5.1 Activité antiprolifératif

Pour étudier l'effet de nos extraits et fractions sur la croissance des cellules cancéreuses humaines de la prostate et du sein, les cellules PC3 et MDA-MB231 ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits et traitées avec différentes concentrations d'extraits pendant 72 h, la viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT. L'absorbance dans chaque puits a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques, et les résultats sont représentés sous forme de graphique.

I.5.1.1 Effet antiprolifératif de l'EAELN et l'EAELT sur les lignées cellulaires PC3 et MDA-MB-231

Les résultats du test MTT ont indiqué que l'EAELN et l'EAELT inhibaient la prolifération des cellules PC3 et MDA-MB-231 de manière significative et dépendante de la concentration (Figure 52), avec IC_{50} de $133,2 \pm 5,73 \mu\text{g/mL}$ et $156,9 \pm 2,83 \mu\text{g/mL}$, respectivement, pour l'EAELN et $415,8 \pm 2,33 \mu\text{g/mL}$ et $307,5 \pm 2,97 \mu\text{g/mL}$, respectivement pour l'EAELT. EAELN a manifesté l'activité antiproliférative la plus élevée contre les deux lignées testées PC3 ($IC_{50} = 133,2 \pm 5,73 \mu\text{g/mL}$) et MDA-MB-231 ($IC_{50} = 156,9 \pm 2,83 \mu\text{g/mL}$) (Tableau 14).

Tableau 14. Valeurs IC₅₀ (µg/mL) de l'EAELN et l'EAELT contre les lignées PC3 et MDA-MB-231

Lignée cellulaire	CI ₅₀ (µg/mL)	
	EAELN	EAELT
PC3	133.2 ± 5.73	415.8 ± 2.33
MDA-MB-231	156.9 ± 2.83	307.5 ± 2.97

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD d'IC₅₀ (µg/mL) à partir de trois expériences indépendantes.

EAELN, Extrait acétate d'éthyle de *L. numidicum.* ; EAELT, Extrait acétate d'éthyle de *L. trigynum.*

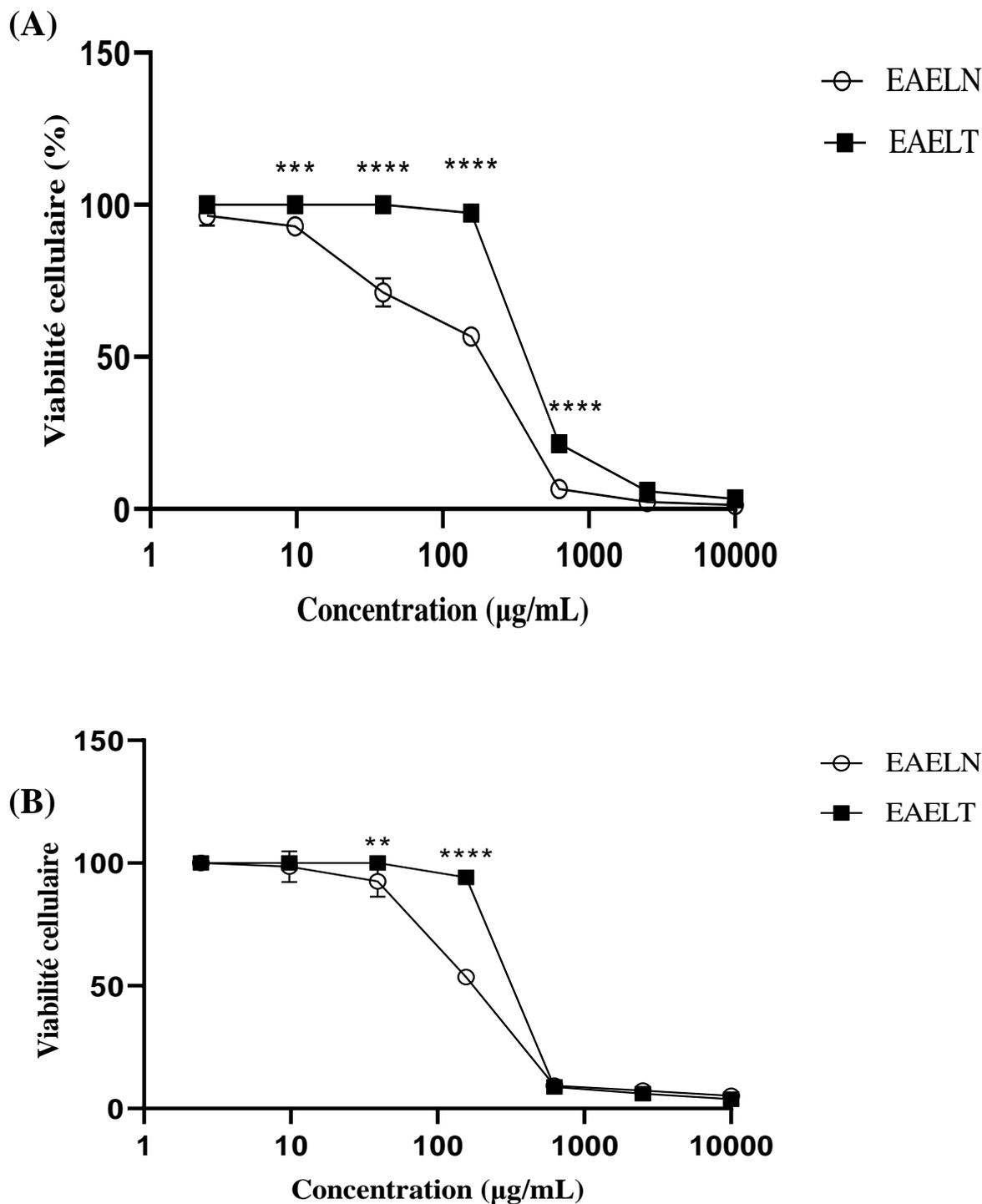


Figure 52. Effets dose-dépendants de l'EAELN et l'EAELT sur la viabilité des cellules cancéreuses PC3 (A) et MDA-MB-231 (B).

La viabilité cellulaire exprimée en pourcentage a été déterminée par un test MTT. Les cellules ont été traitées avec les deux extraits à différentes concentrations (0-10,000 µg/mL) pendant 72 h. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 3), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

< 0,0001, EATEN versus EAELT. ANOVA à deux facteurs suivie de la correction de Bonferroni.

I.5.1.2 Effet antiprolifératif des fractions VLC de l'EBLN (F1-F6) sur les cellules PC3 et MDA-MB-231

Le fractionnement de l'EBLN par VLC a été bioguidé par les tests de l'activité antioxydante et antiproliférative.

Six fractions ont été obtenues après rassemblement des fractions présentant des similitudes : F1 (MeOH/H₂O, 20:80, v/v), F2 (30/70), F3 (40/60), F4 (60/40), F5 (80/20), et F6 (100/0).

L'évaluation de l'activité antiproliférative des fractions obtenues a indiqué que l'activité antiproliférative est localisée dans deux fractions F1 (20/80) et F6 (100/0) (Figure 53).

F1 et F6 ont inhibé la prolifération des cellules PC3 et MDA-MB 231 de manière dose-dépendante avec des IC₅₀ de 182.07 ± 4.40 µg/mL et 175.85 ± 3.75 µg/mL, respectivement pour F1 et 158.6 ± 0.82 µg/mL et 117.13 ± 5.37 µg/mL, respectivement pour F6 (Tableau 15).

Tableau 15. Valeurs IC₅₀ (µg/mL) des fractions VLC de l'EBLN contre les cellules

Fractions	PC3 et MDA-MB-231	
	Lignées cellulaires	
	PC3	MDA-MB231
F1	182.07 ± 4.40	175.85 ± 3.75
F2	> 2000	1049.5 ± 4.95
F3	>2000	>2000
F4	545.5 ± 0.71	791.75 ± 4.31
F5	1538 ± 5.66	1046.33 ± 4.24
F6	158.6± 0.82	117.13 ±5.37

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD d'IC₅₀ (µg/mL) à partir de trois expériences indépendantes.

F, fraction ; EBLN, extrait *n*-BuOH de *L. numidicum*.

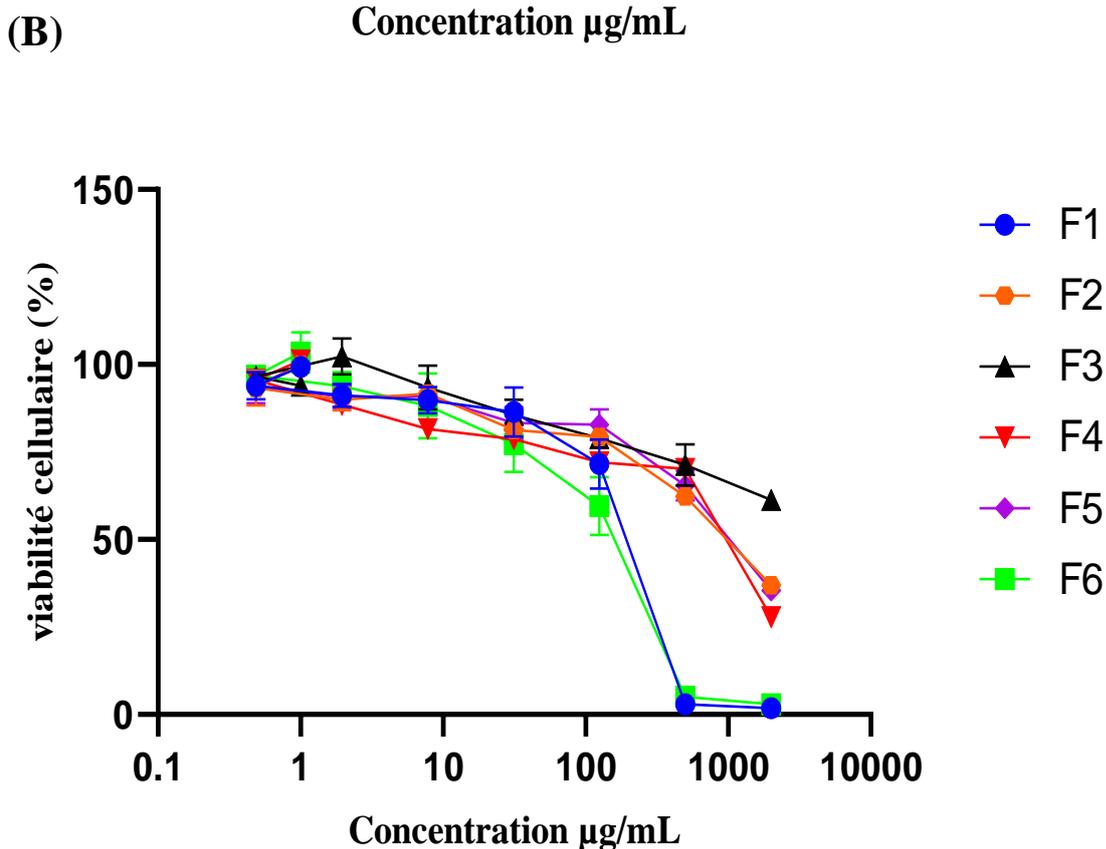
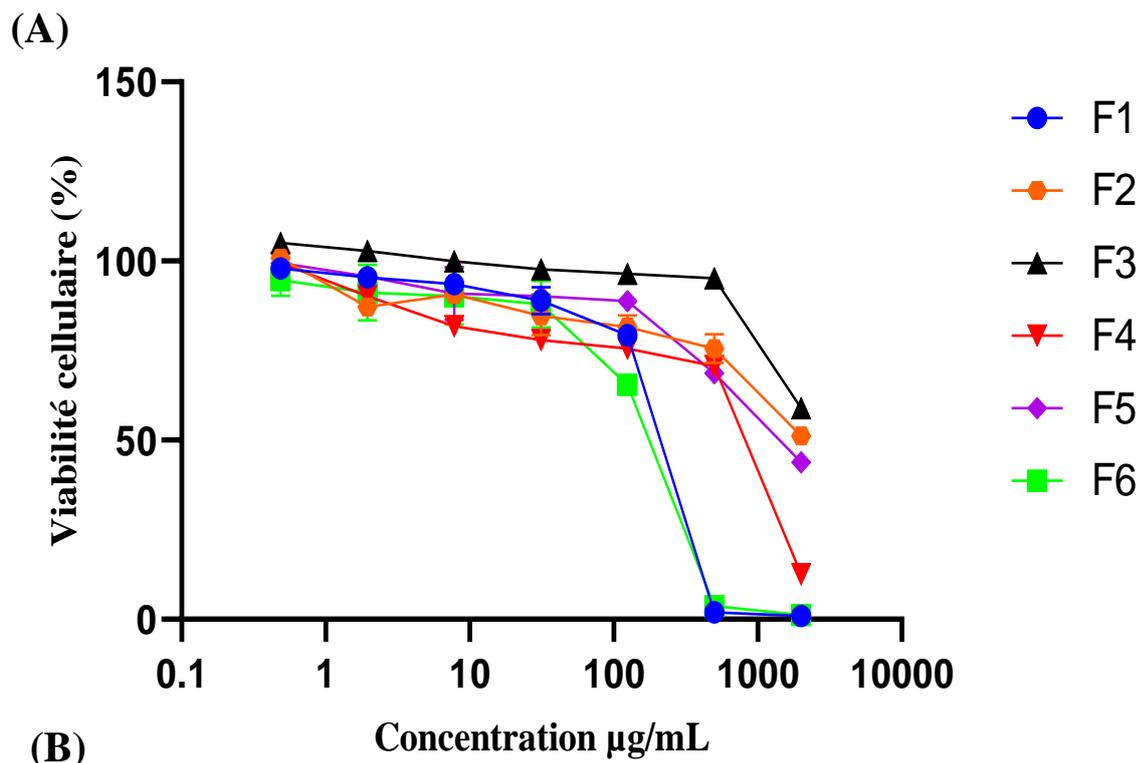


Figure 53. Effet dose-dépendant de F1 et F6 sur la viabilité des cellules cancéreuses

(A) PC3, (B) MDA-MB-231.

La viabilité cellulaire exprimée en pourcentage a été déterminée par un test MTT. Les cellules ont été traitées avec les six fractions à différentes concentrations pendant 72 h. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 3).

I.5.2 Activité apoptotique

Pour explorer le mécanisme par lequel l'EAELN, l'EAELT et les fractions VLC les plus actives (F1 et F6) de L'EBLN inhibent la prolifération cellulaire de la lignée PC3, une analyse de l'apoptose par cytomètre en flux Accuri TM-C6 (BD-Biosciences), utilisant une double coloration à l'annexine V-FITC/IP a été réalisée après une période d'exposition de 24 h à différentes concentrations.

Les résultats de l'analyse statistique de l'activité antiprolifératives ont montrés que les deux extraits (EAELN et EAELT) induisent des effets identiques sur les deux lignées cellulaires (pas de différence significative) et que par ailleurs les fractions sélectionnées (1 et 6) ont également produit des résultats comparables. Nous avons donc fait l'hypothèse que le mécanisme d'action était le même et on s'est focalisé sur une ligné (PC3) pour la cytométrie en flux.

I.5.2.1 Induction de l'apoptose des cellules PC3 par l'EAELN et l'EAELT

Les figures 54 et 55 ; 56 et 57 représentent les histogrammes représentatifs obtenus de cellules PC3 triées par cytométrie en flux après traitement avec l'EAELN et l'EAELT.

L'EAELN et l'EAELT ont induit une apoptose des cellules PC3, mise en évidence par l'accumulation de cellules apoptotiques précoces (Q-LR) et tardives (Q-UR), et par la diminution significative des cellules viables (Q-LL), avec un effet plus important à la dose 500 et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (****p < 0,0001) par rapport au contrôle négatif.

La proportion de cellules apoptotiques totales (précoces et tardives) après traitement avec l'EAELN est passée de 8,3 \pm 2,26 % (contrôle) à 19 \pm 2,47 % (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 87,5 \pm 0,21 % (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et 92 \pm 0,07 % (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivement (Figure 54 et 55).

Après traitement avec l'EAELT, la proportion de cellules apoptotiques totales est passée de 8,2 \pm 2,33 % (contrôle) à 19,1 \pm 0,35 % (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 50,4 \pm 1,77 % (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et 74,4 \pm 1,27 % (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivement (Figure 56 et 57).

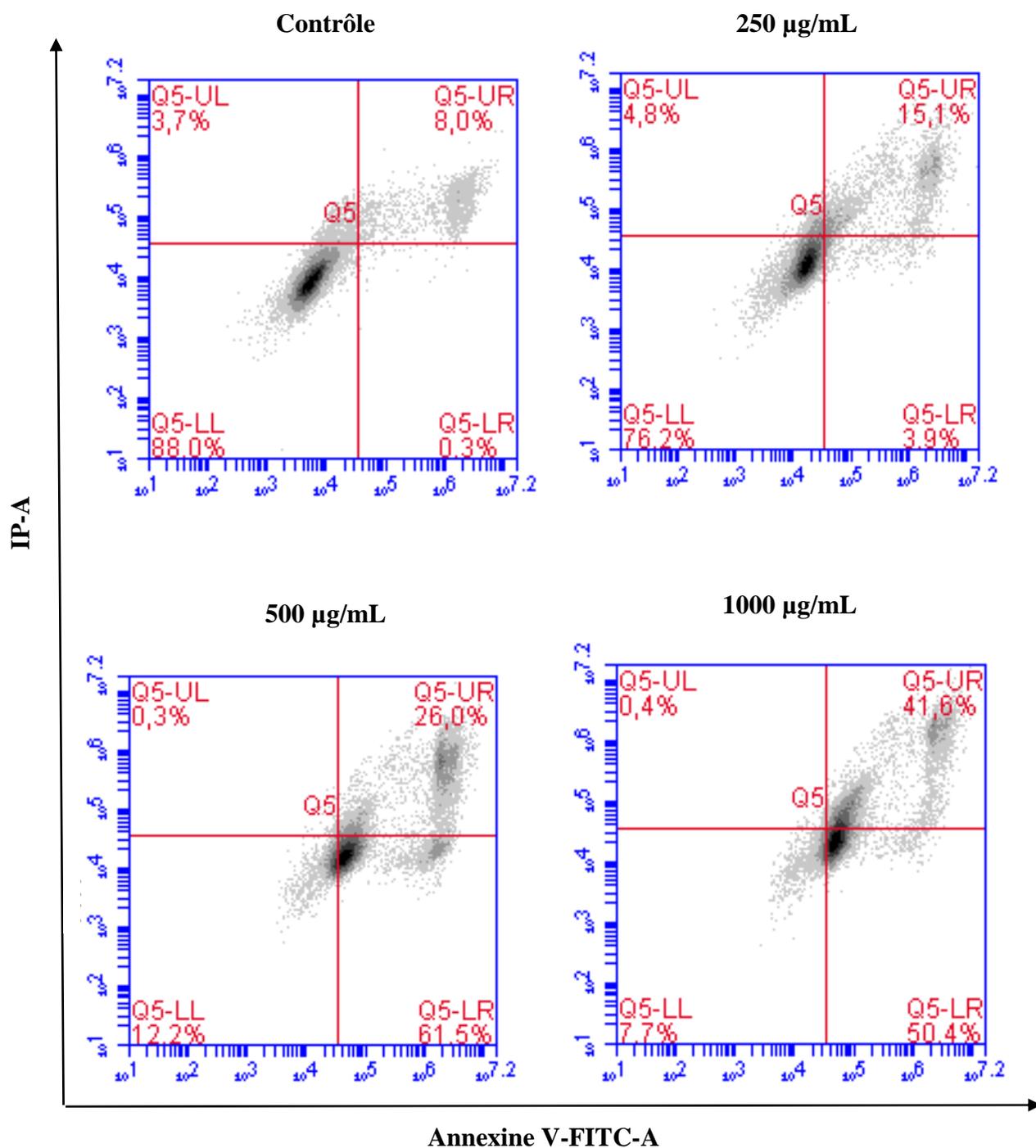


Figure 54. Induction de l'apoptose des cellules PC3 par l'EAELN.

Histogrammes représentatifs de cellules triées par cytométrie en flux.

Les cellules ont été traitées avec l'extrait pendant 24h à différentes concentrations (250, 500 et 1000 µg/mL) et colorées avec l'annexine V-FITC et l'iodure de propidium avant le tri par cytométrie en flux. Les cellules des quadrants Q-LL, Q-LR, Q-UR, et Q-UL représentent

respectivement les populations viables, apoptotiques précoces, apoptotiques tardives et nécrotiques.

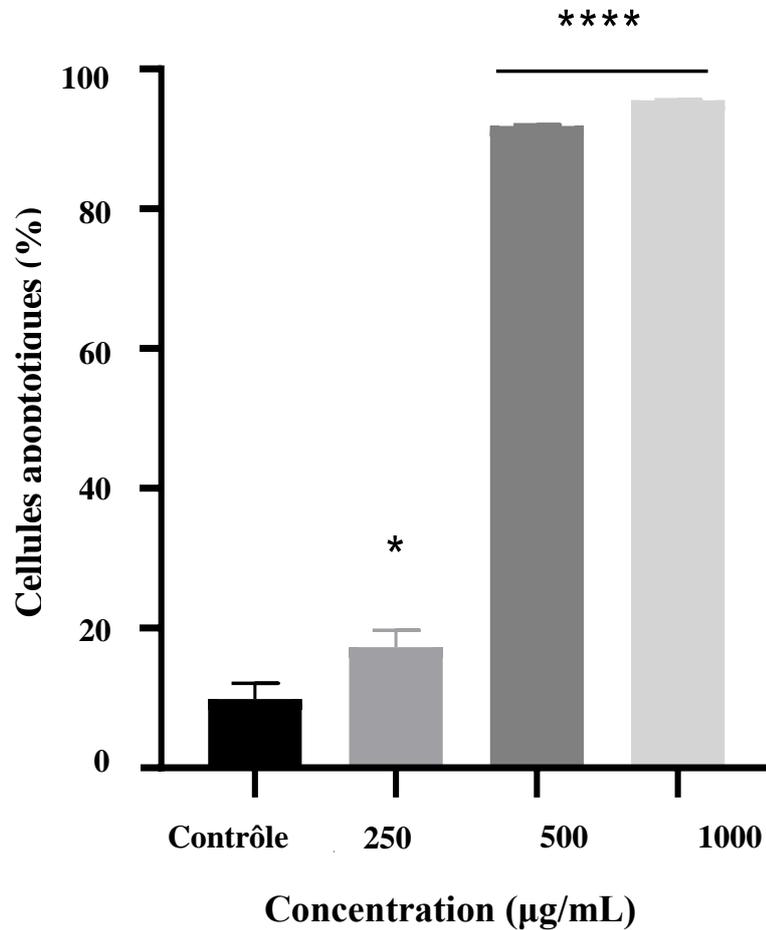


Figure 55. Quantification des cellules apoptotiques après traitement avec l'EAELN.

Le pourcentage de cellules apoptotiques a été calculé. Chaque barre représente la moyenne \pm SD (n = 3), *P < 0.05, ****P < 0.0001, par rapport au contrôle négatif. ANOVA à un facteur suivie de la correction de Bonferroni.

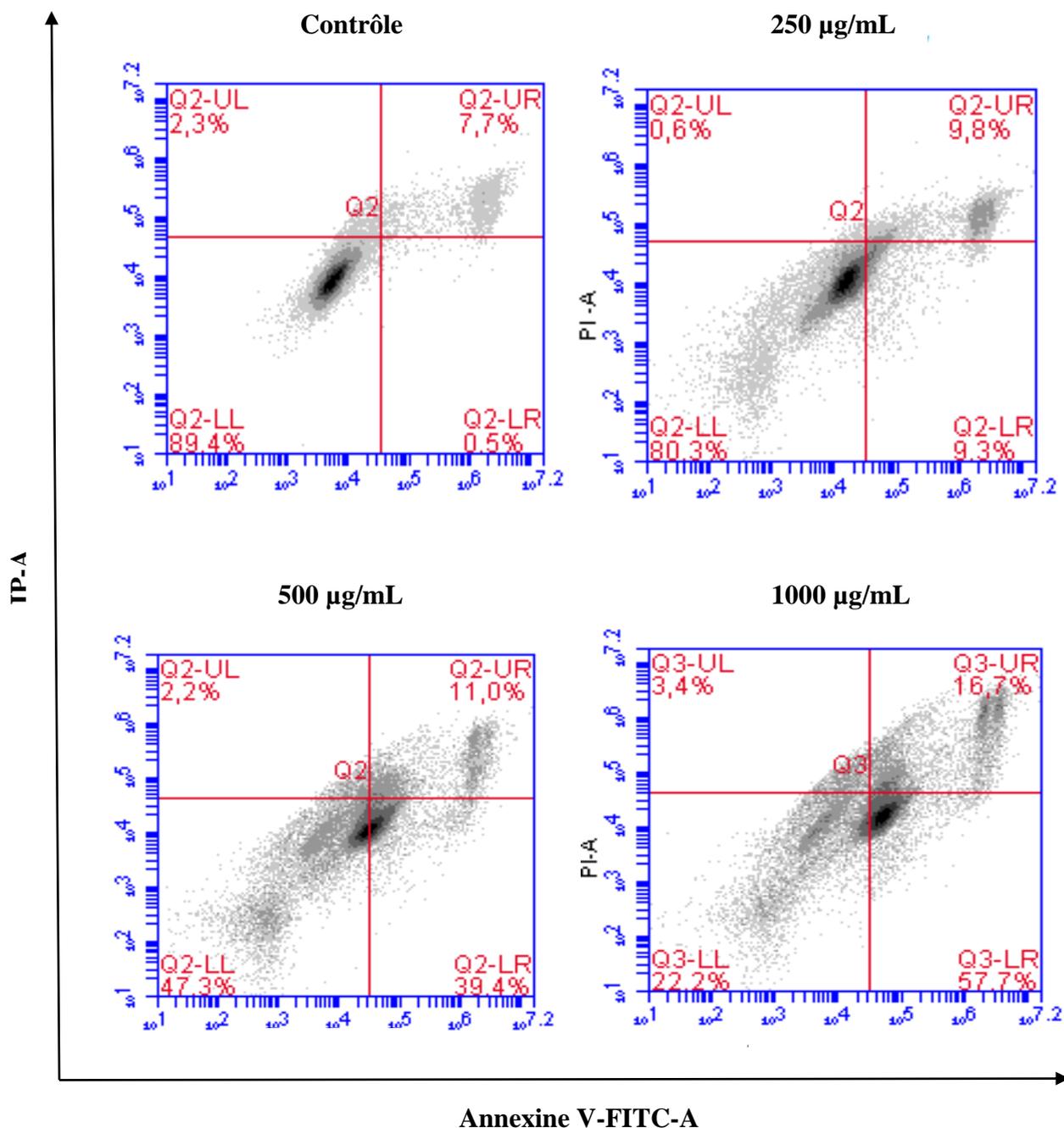


Figure 56. Induction de l'apoptose des cellules PC3 par l'EAELT.

Les cellules ont été traitées avec l'extrait pendant 24h à différentes concentrations (250, 500 et 1000 µg/mL) et colorées avec l'annexine V-FITC et l'IP avant le tri par cytométrie en flux. Les cellules des quadrants Q-LL, Q-LR, Q-UR, et Q-UL représentent respectivement les populations viables, apoptotiques précoces, apoptotiques tardives et nécrotiques.

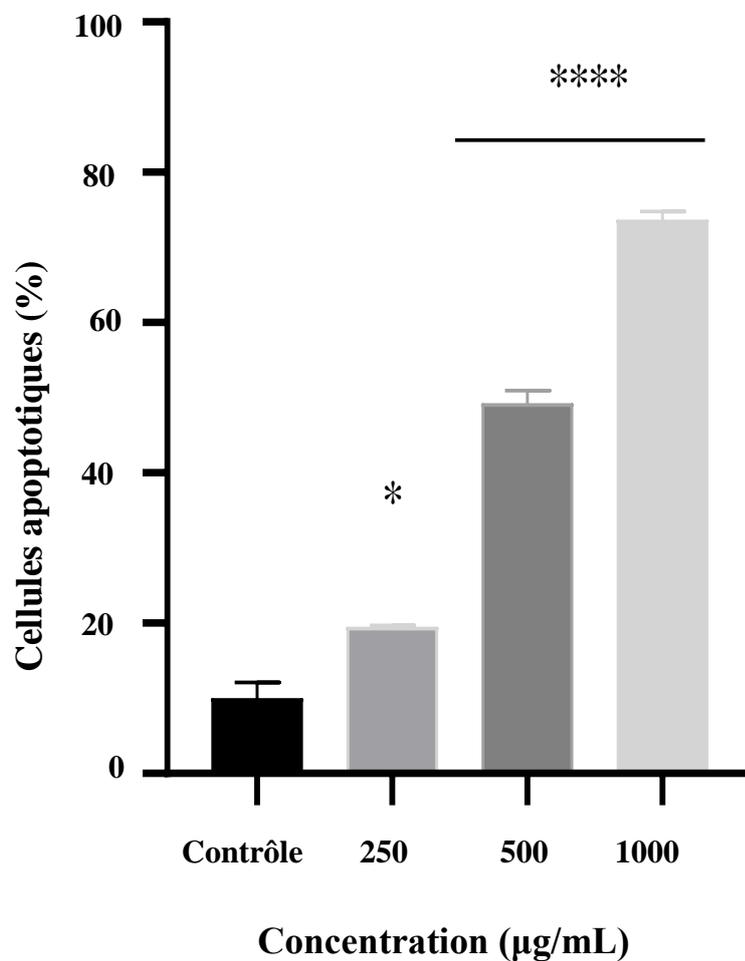


Figure 57. Quantification des cellules apoptotiques après traitement avec EAELN. Le pourcentage de cellules apoptotiques a été calculé. Chaque barre représente la moyenne \pm SD ($n = 3$), $*P < 0.05$, $****P < 0.0001$, par rapport au contrôle négatif. ANOVA à un facteur suivie de la correction de Bonferroni.

I.5.2.2 Induction de l'apoptose des cellules PC3 par F1 et F6

F1 et F6 ont également induit l'apoptose des cellules PC3, mise en évidence par l'accumulation de cellules apoptotiques précoces et tardives, et par la diminution des cellules viables, avec un effet plus important à 125 et 250 $\mu\text{g/mL}$ (**** $p < 0.0001$) par rapport au témoin négatif (Figure 58, 59, 60 et 61).

La proportion de cellules apoptotiques totales (précoces et tardives) après traitement avec F1 est passée de $14.2 \pm 0.77 \%$ (contrôle) à $18.3 \pm 1.1 \%$ (65.5 $\mu\text{g/mL}$), $47.5 \pm 0.8 \%$ (125 $\mu\text{g/mL}$) et $92.4 \pm 1.8 \%$ (250 $\mu\text{g/mL}$), respectivement (Figure 58 et 59), et après traitement avec F6, la proportion de cellules apoptotiques totales est passée de $14.2 \pm 0.77 \%$ (contrôle) à $24.2 \pm 1.32 \%$ (65.5 $\mu\text{g/mL}$), $68.9 \pm 1.34 \%$ (125 $\mu\text{g/mL}$) et $97.2 \pm 0.4 \%$ (250 $\mu\text{g/mL}$), respectivement (Figure 60 et 61).

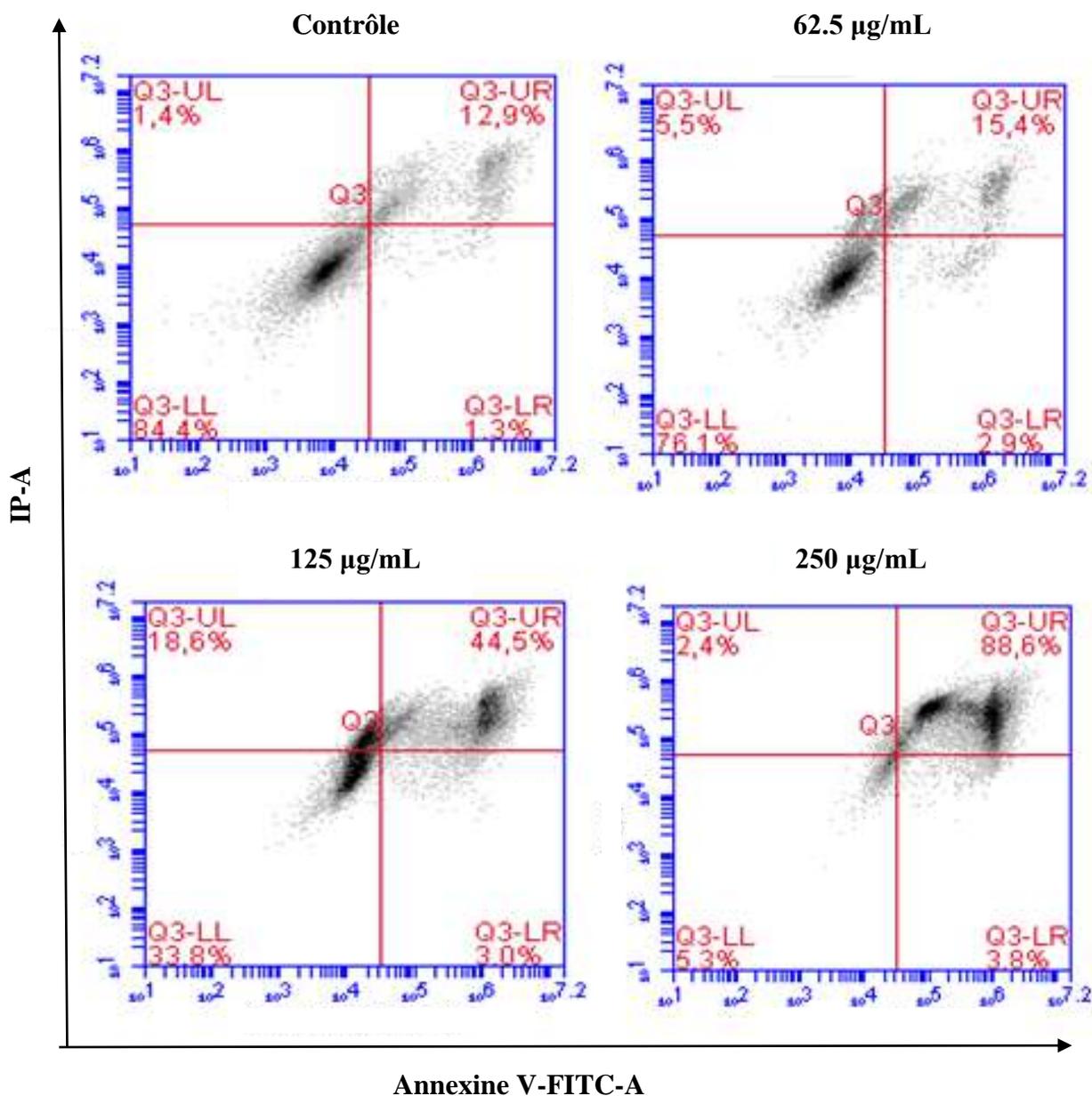


Figure 58. Induction de l'apoptose des cellules PC3 par F1.

Histogrammes représentatifs de cellules triées par cytométrie en flux.

Les cellules ont été traitées avec l'extrait pendant 24 h à différentes concentrations (62.5, 125, et 500 µg/ mL) et colorées à l'annexine V-FITC et à l'IP avant d'être triées par cytométrie en flux. Les cellules des quadrants Q-UL, Q-UR, Q-LL et Q-LR représentent respectivement les populations nécrotiques, apoptotiques tardives, viables et apoptotiques précoces.

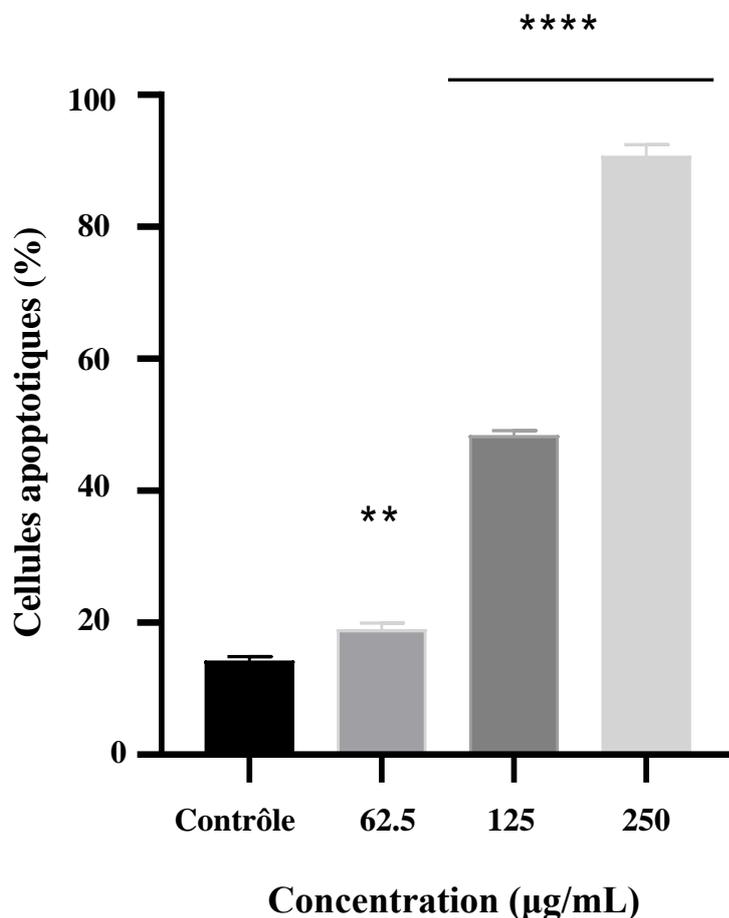


Figure 59. Quantification des cellules apoptotiques (PC3) après traitement avec F1. Le pourcentage de cellules apoptotiques a été calculé. Chaque barre représente la moyenne \pm SD (n = 3), ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, par rapport au contrôle négatif. ANOVA à un facteur suivie de la correction de Bonferroni.

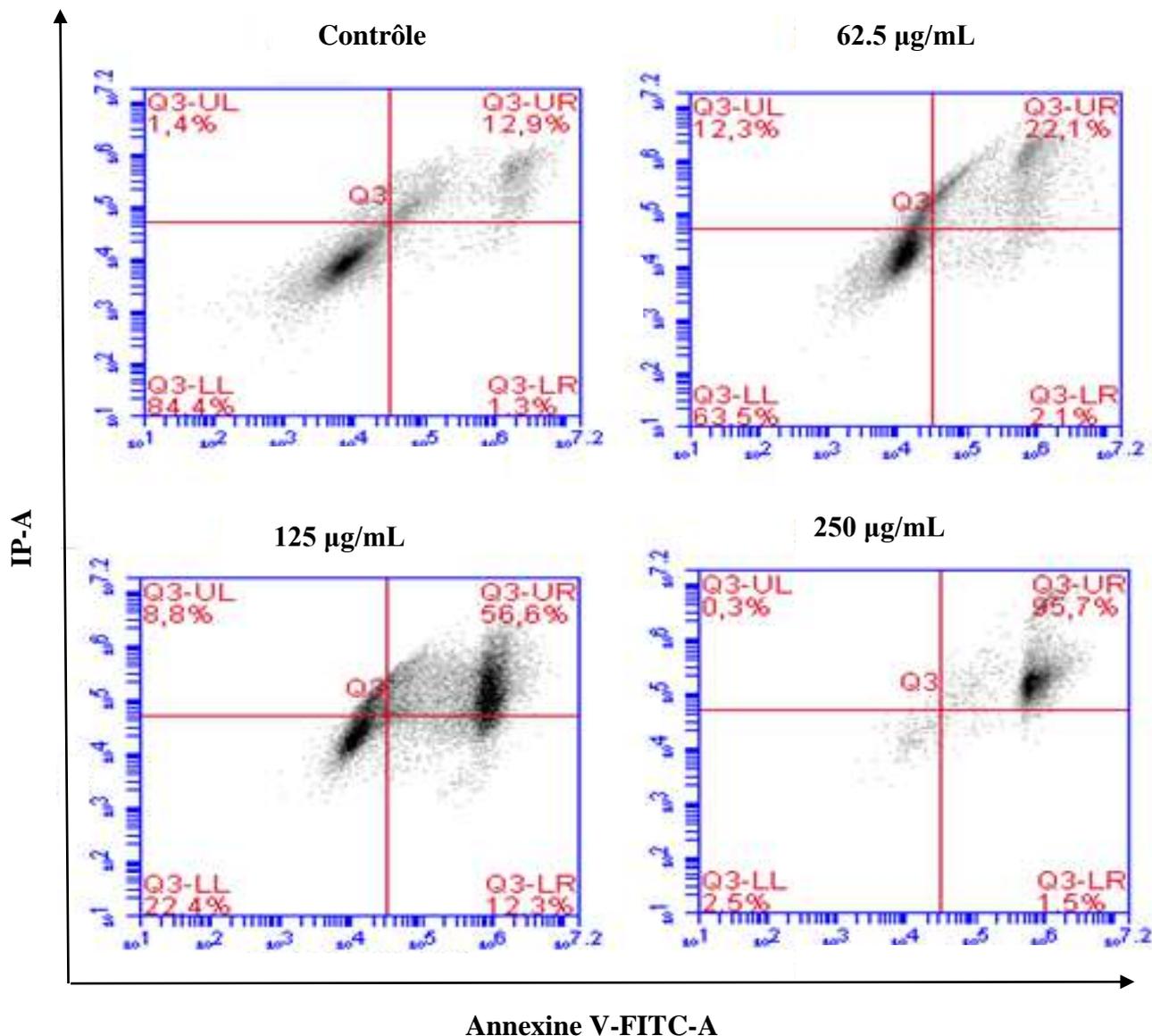


Figure 60. Induction de l'apoptose des cellules PC3 par F6.

Histogrammes représentatifs de cellules triées par cytométrie en flux. Les cellules ont été traitées avec l'extrait pendant 24 h à différentes concentrations (62.5, 125, et 500 µg / mL) et colorées à l'annexine V-FITC et à l'IP avant d'être triées par cytométrie en flux. Les cellules des quadrants Q-UL, Q-UR, Q-LL et Q-LR représentent respectivement les populations nécrotiques, apoptotiques tardives, viables et apoptotiques précoces.

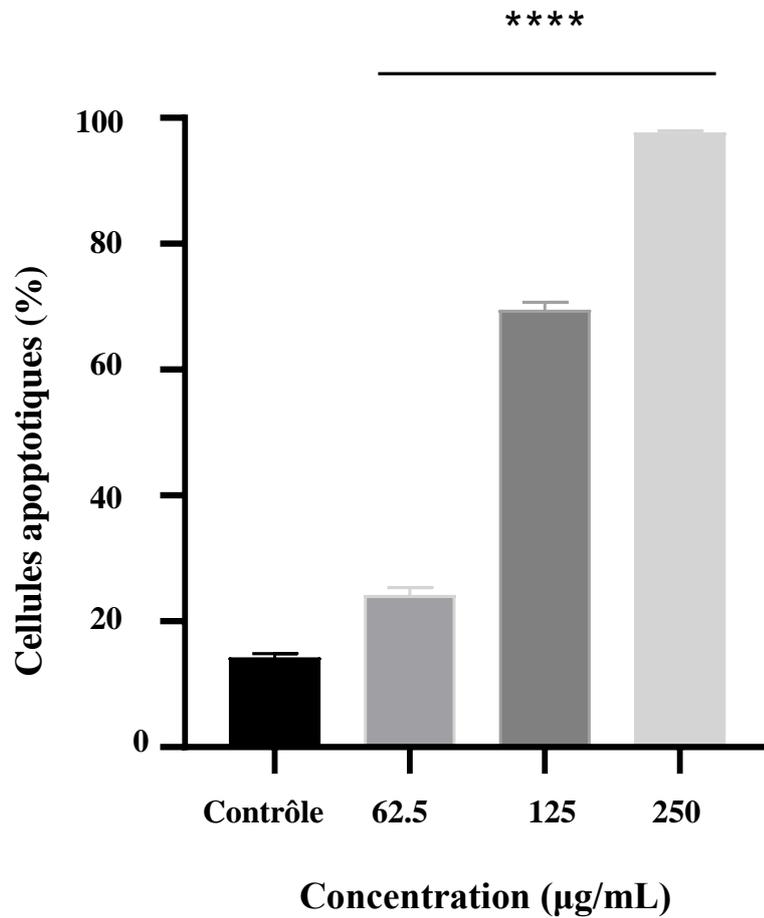


Figure 61. Quantification des cellules apoptotiques (PC3) après traitement avec F6.

Le pourcentage de cellules apoptotiques a été calculé. Chaque barre représente la moyenne \pm SD ($n = 3$), **** $p < 0.0001$, par rapport au contrôle négatif. ANOVA à un facteur suivie de la correction de Bonferroni.

I.5.3 Induction de l'arrêt du cycle cellulaire des cellules PC3 par l'EAELN et l'EAELT

L'EAELN et l'EAELT ont été testés pour leur capacité à bloquer le cycle cellulaire. Malheureusement, les quantités des fractions 1 et 6, n'étaient pas suffisantes pour leur caractérisation.

Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel l'EAELN et l'EAELT inhibent la prolifération cellulaire, une analyse par cytométrie en flux utilisant la coloration IP/RNase a été réalisée pour évaluer la distribution du cycle cellulaire des lignées PC3 après 24 h d'exposition à 250, 500 et 1000 µg/mL d'extrait.

Le cycle cellulaire a été déterminé à l'aide d'un kit de détection du cycle cellulaire (BD Pharmingen TM PI/RNase Staining Buffer).

Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux de la distribution cellulaire (G0/G1, S et G2/M) après traitement avec l'EAELN et l'EAELT sont représentés par des histogrammes de fréquence de teneur en ADN cellulaire (fluorescence IP) (Figure 62 et 64).

Les pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après traitement avec l'EAELN et l'EAELT sont indiqués dans le graphique à barres (Figure 63 et 65).

Après traitement avec l'EAELN, le pourcentage de cellules en phase G0/G1 et S a été réduit, tandis que celui en phase G2/M a été significativement augmenté (**** $p < 0.0001$) (figure 62 et 63).

Le pourcentage de cellules en phase G0/G1 dans les trois groupes d'échantillons traités avec l'EAELN est de $75.60 \pm 0.47 \%$, $73.75 \pm 0.22 \%$ et 71.79 ± 0.01 (***) $p < 0.001$ pour 250, 500 et 1000 µg/mL, respectivement, alors que celui du témoin est de $74.46 \pm 0.49 \%$.

Le pourcentage de cellules en phase S est passé de $19.29 \pm 1.39 \%$ (contrôle) à $5.66 \pm 0.53 \%$ (250 µg/mL), $7.96 \pm 0.20 \%$ (500 µg/mL) et 10.55 ± 0.55 (1000 µg/mL), tous **** $p < 0.0001$ par rapport au contrôle, alors que celui en phase G2/M est passé de $7.50 \pm 1.36\%$ (contrôle) à $18.73 \pm 0.67\%$ (250 µg/mL), $18.29 \pm 0.12\%$ (500 µg /mL), et $17.72 \pm 0.64 \%$ (1000 µg/mL), tous $p < 0.0001$ par rapport au contrôle négatif.

Le traitement avec l'EAELT a montré des effets différents dans différentes phases du cycle cellulaire, le pourcentage de cellules en phase S étant réduit, tandis que celui de la phase

G0/G1 et G2/M a augmenté de manière significative (Figure 64 et 65).

Le pourcentage de cellules en phase G0/G1 après traitement avec l'EAELT est passé de 74.46 ± 0.49 % (contrôle) à 72.35 ± 1.20 % (250 $\mu\text{g/mL}$, $*p < 0.05$), 77.36 ± 1.38 % (500 $\mu\text{g/mL}$, $** p < 0.01$) et 78.58 ± 0.37 % (1000 $\mu\text{g/mL}$, $****p < 0.0001$), respectivement, et celui de la phase G2/M est passé de 6.25 ± 0.92 % (contrôle) à 16.23 ± 0.97 % (250 $\mu\text{g/mL}$), 16.39 ± 0.79 % (500 $\mu\text{g/mL}$) et 15.80 ± 1.32 % (1000 $\mu\text{g/mL}$), respectivement, tous $****p < 0.0001$ par rapport au témoin, alors que le pourcentage de cellules en phase S a été significativement réduit ($****p < 0.0001$) de 19.29 ± 1.39 (témoin) à 11.42 ± 0.44 (250 $\mu\text{g/mL}$), 6.25 ± 0.68 (500 $\mu\text{g/mL}$) et 5.62 ± 1.1 (1000 $\mu\text{g/mL}$).

Nos résultats ont montré que l'EAELN induit un arrêt significatif du cycle cellulaire dans la phase G2/M (Figure 62 et 63), tandis qu'un arrêt dans les phases G0/G1 et G2/M a été observé après exposition à diverses concentrations d'EAELT, pendant 24h (Figure 64 et 65).

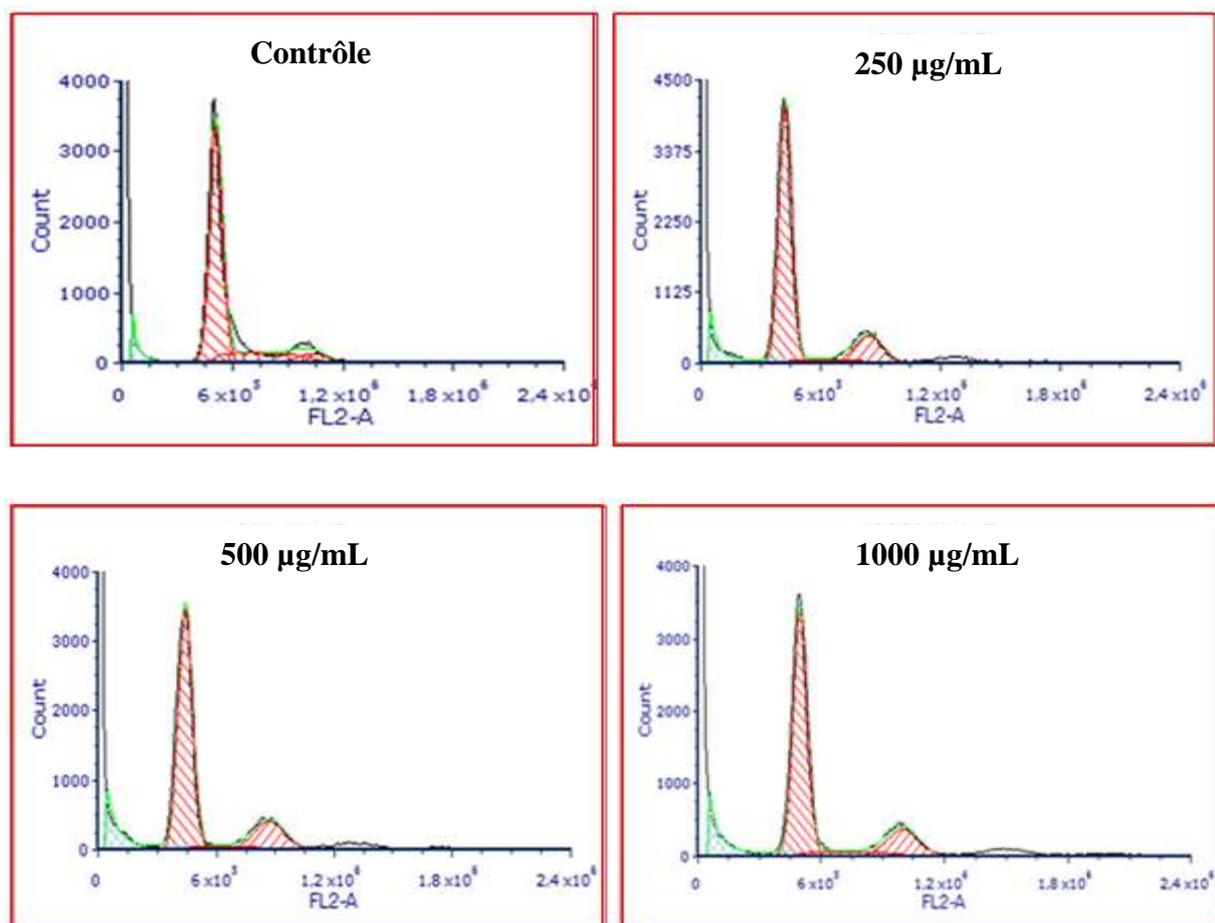


Figure 62. Distribution des cellules PC3 dans les phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) après traitement avec l'EAELN.

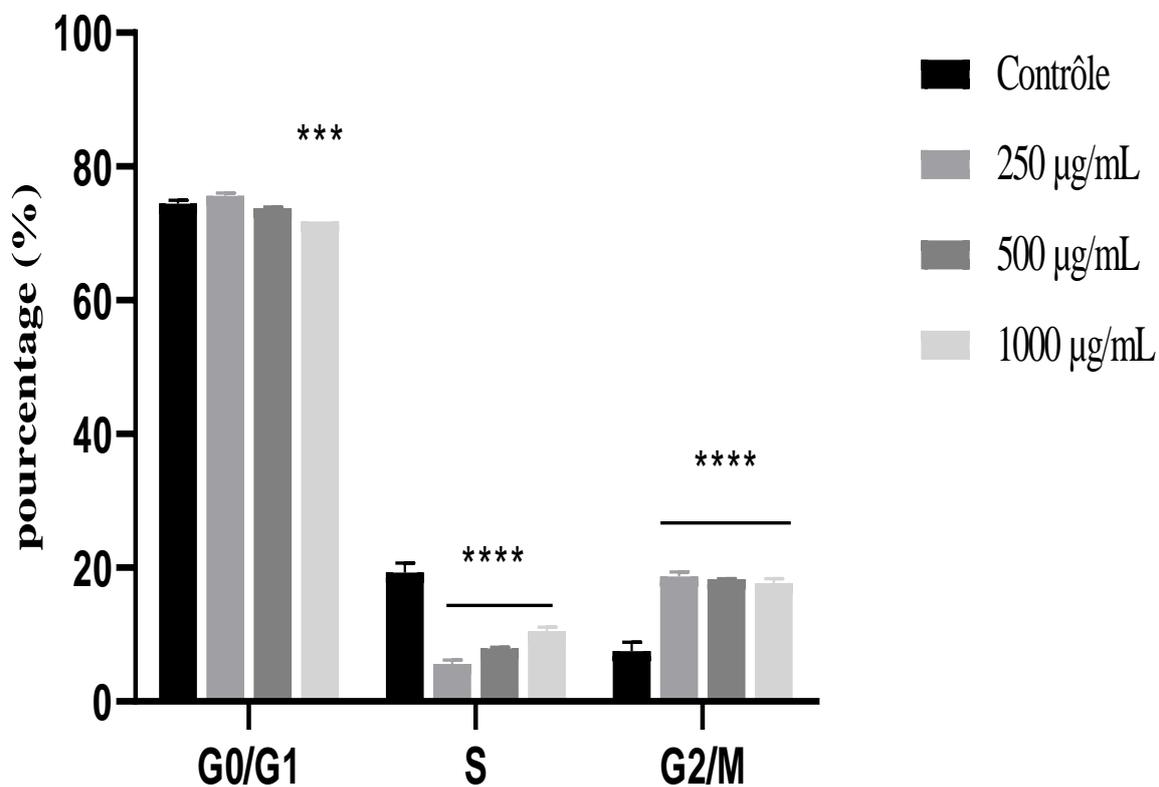


Figure 63. Histogramme de la distribution du cycle cellulaire (%) dans les cellules PC3 traitées avec l'EAELN.

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SD (n = 3), *** p < 0.001, **** p < 0.0001, par rapport au contrôle négatif. ANOVA à deux facteurs suivie de la correction de Bonferroni.

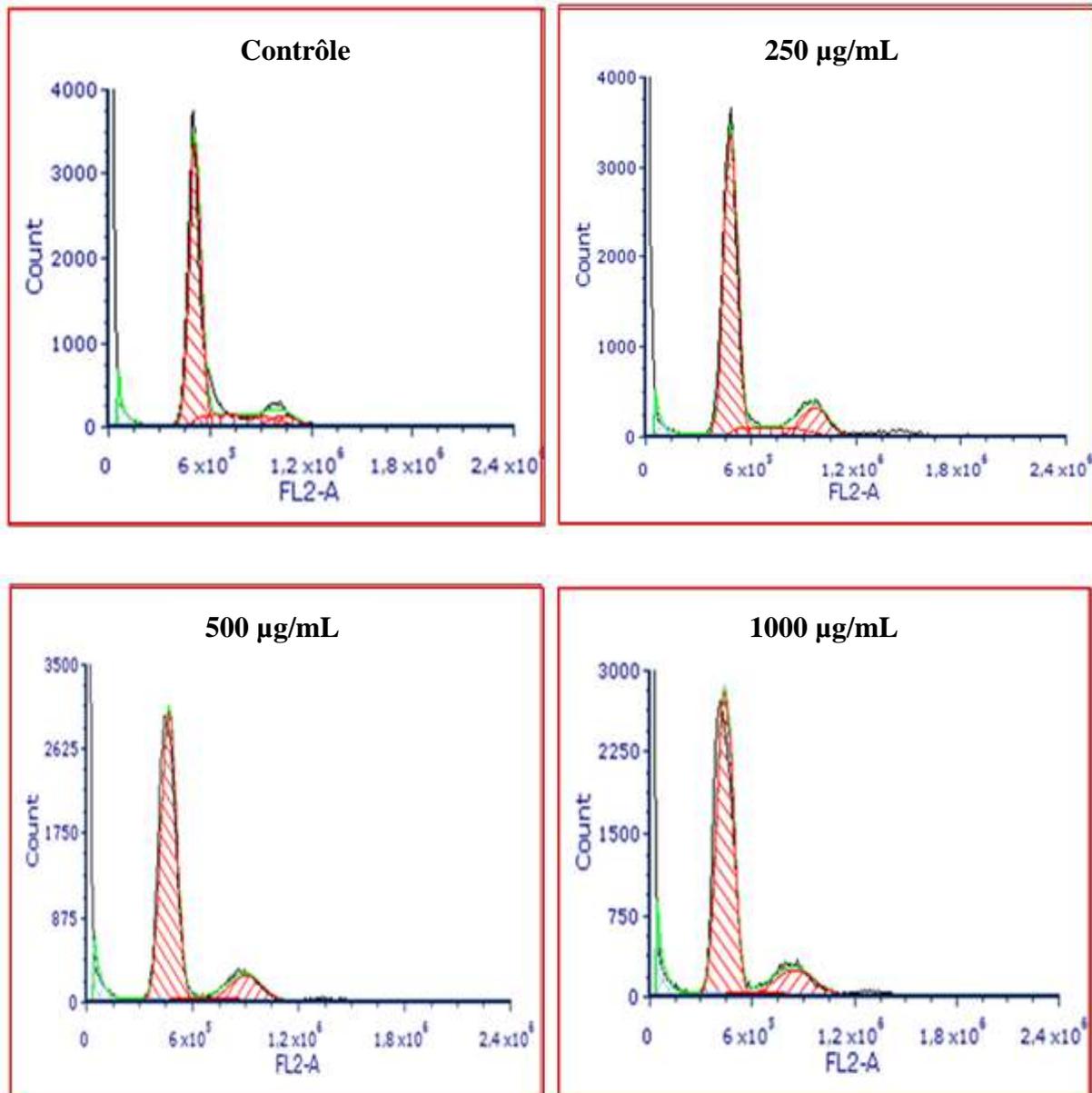


Figure 64. Distribution des cellules PC3 dans les phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) après traitement avec l'EAELT.

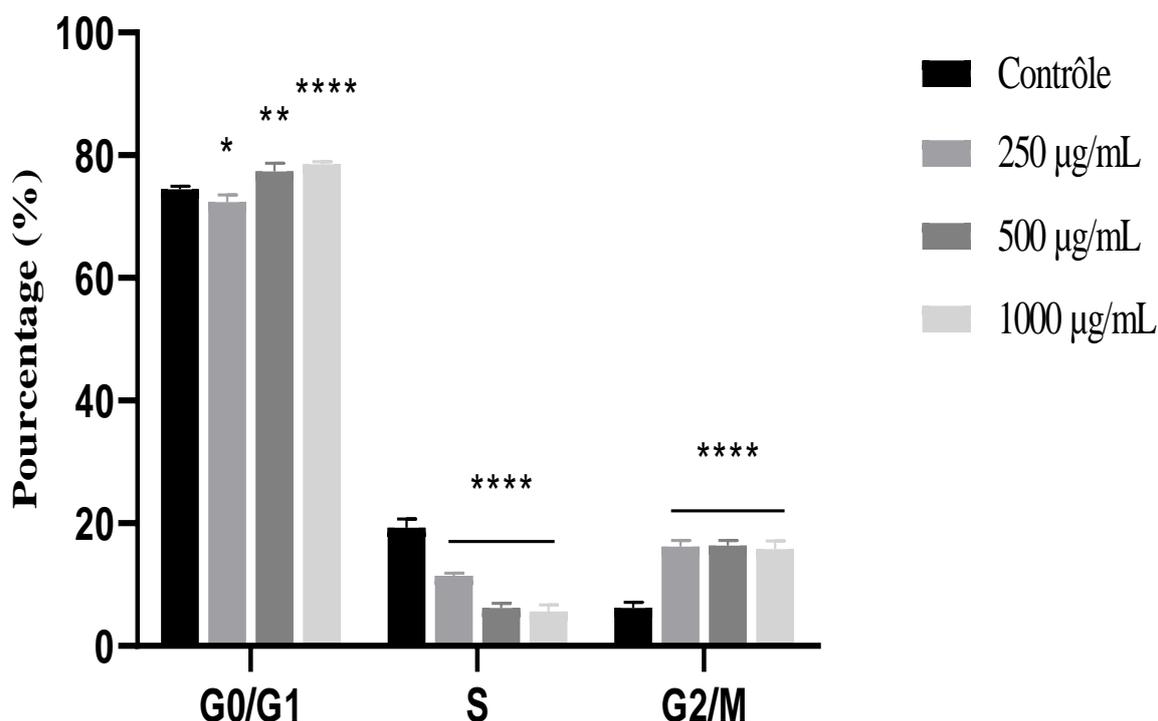


Figure 65. Histogramme de la distribution du cycle cellulaire (%) dans les cellules PC3 traitées avec l'EAELT.

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SD (n = 3), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, par rapport au contrôle négatif. ANOVA à deux facteurs suivie de la correction de Bonferroni.

I.6 Analyses LC-HRMS/MS

Les métabolites secondaires de l'EAELN, l'EAELT et des fractions VLC les plus actives (F1 et F6) de l'EBLN ont été analysés par LC-HRMS/MS pour déterminer la relation entre leur activité et leur composition chimique, permettant d'étudier le mécanisme d'action à partir de différents points de vue.

I.6.1 Analyses LC-HRMS/MS de l'EAELN et de l'EAELT

Les analyses LC-HRMS/MS de l'EAELN et l'EAELT ont révélé la présence de 75 composés (Tableau 16 et Figure 66, 67,68, 69) dans chaque extrait. Les métabolites ont été

identifiés à l'aide de la plateforme GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking).

RT: 0.00 - 45.01

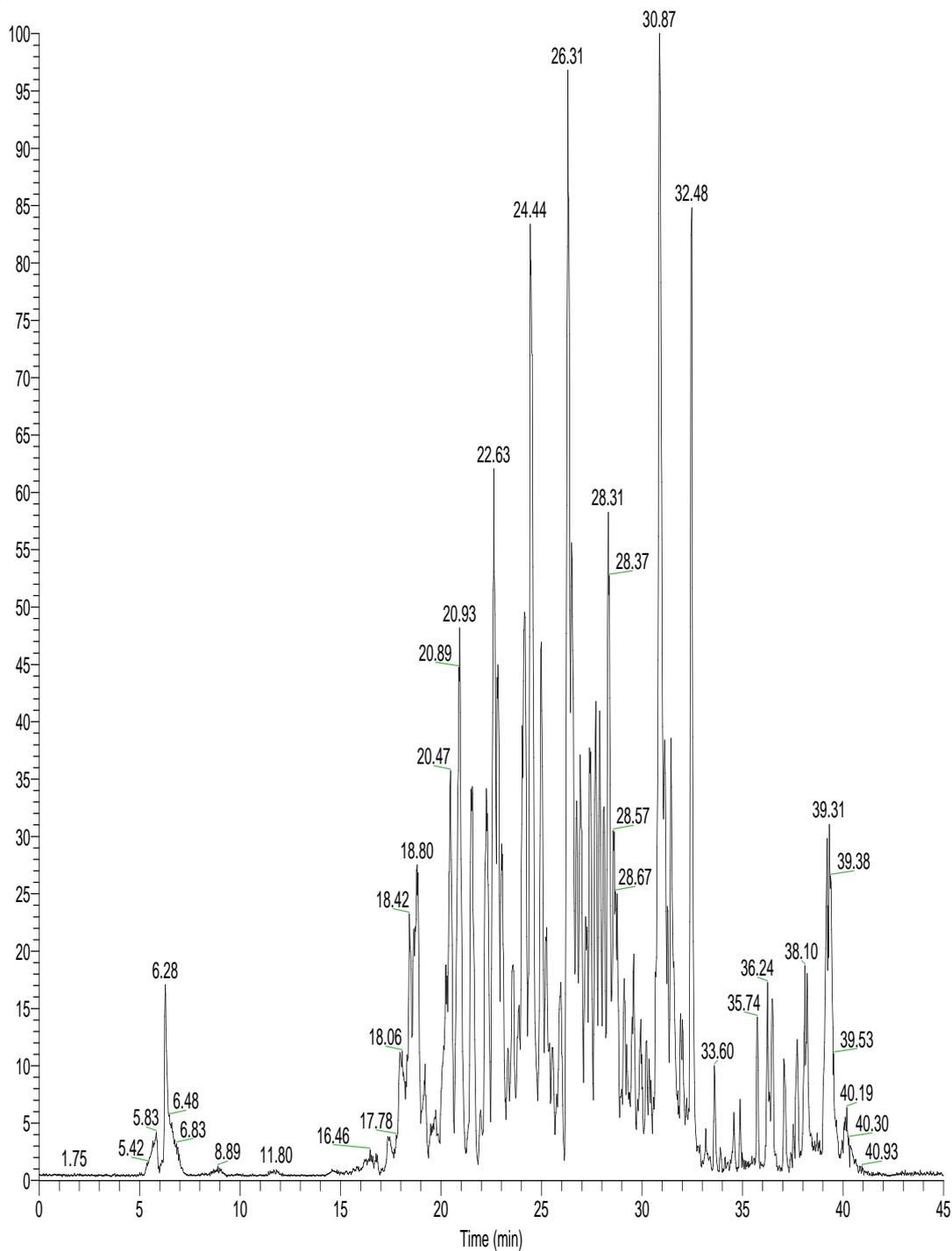


Figure 66. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELN en mode ions négatifs.

RT: 0.00 - 45.01

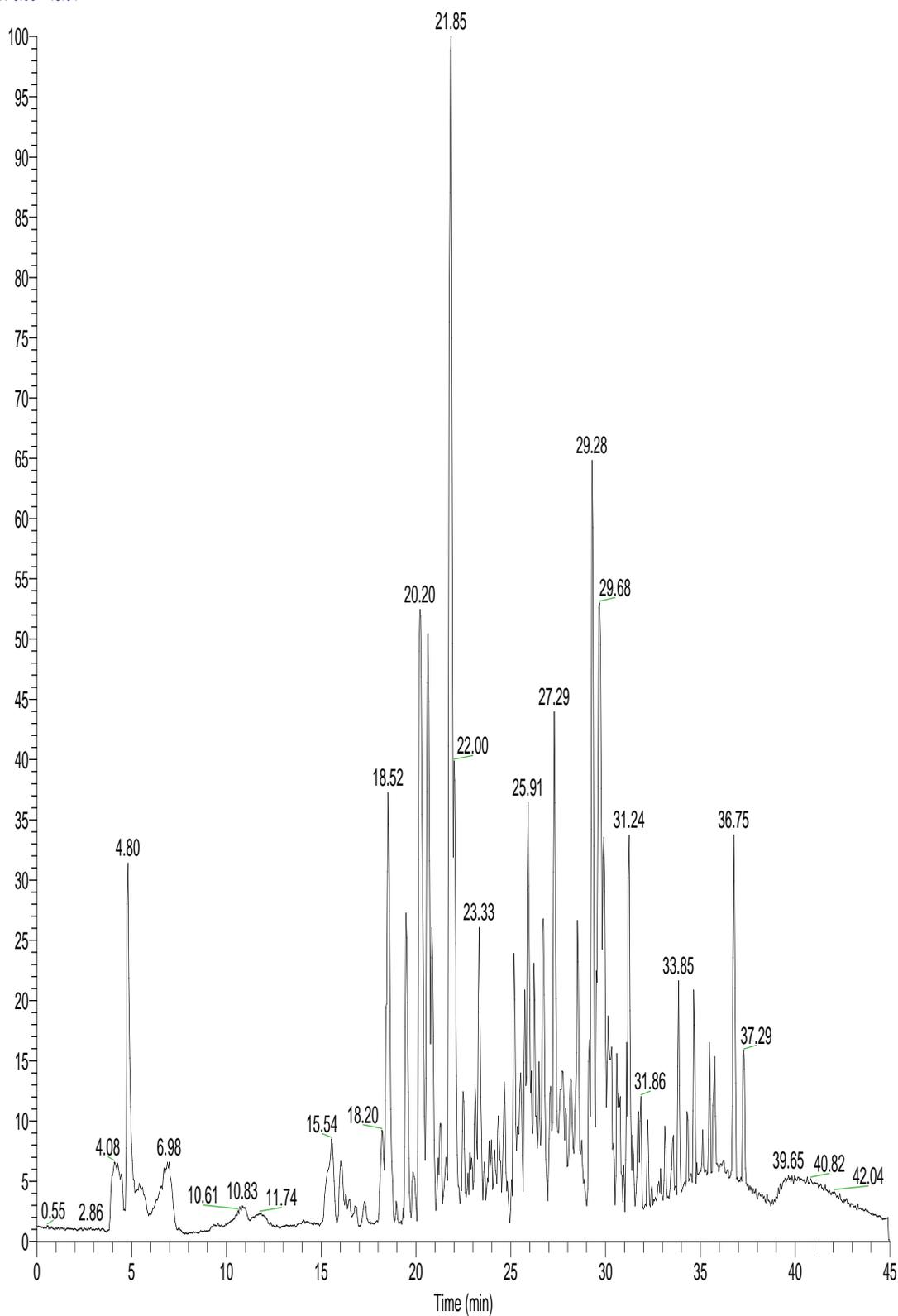


Figure 67. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELN en mode ions positifs.

RT: 0.00 - 45.02

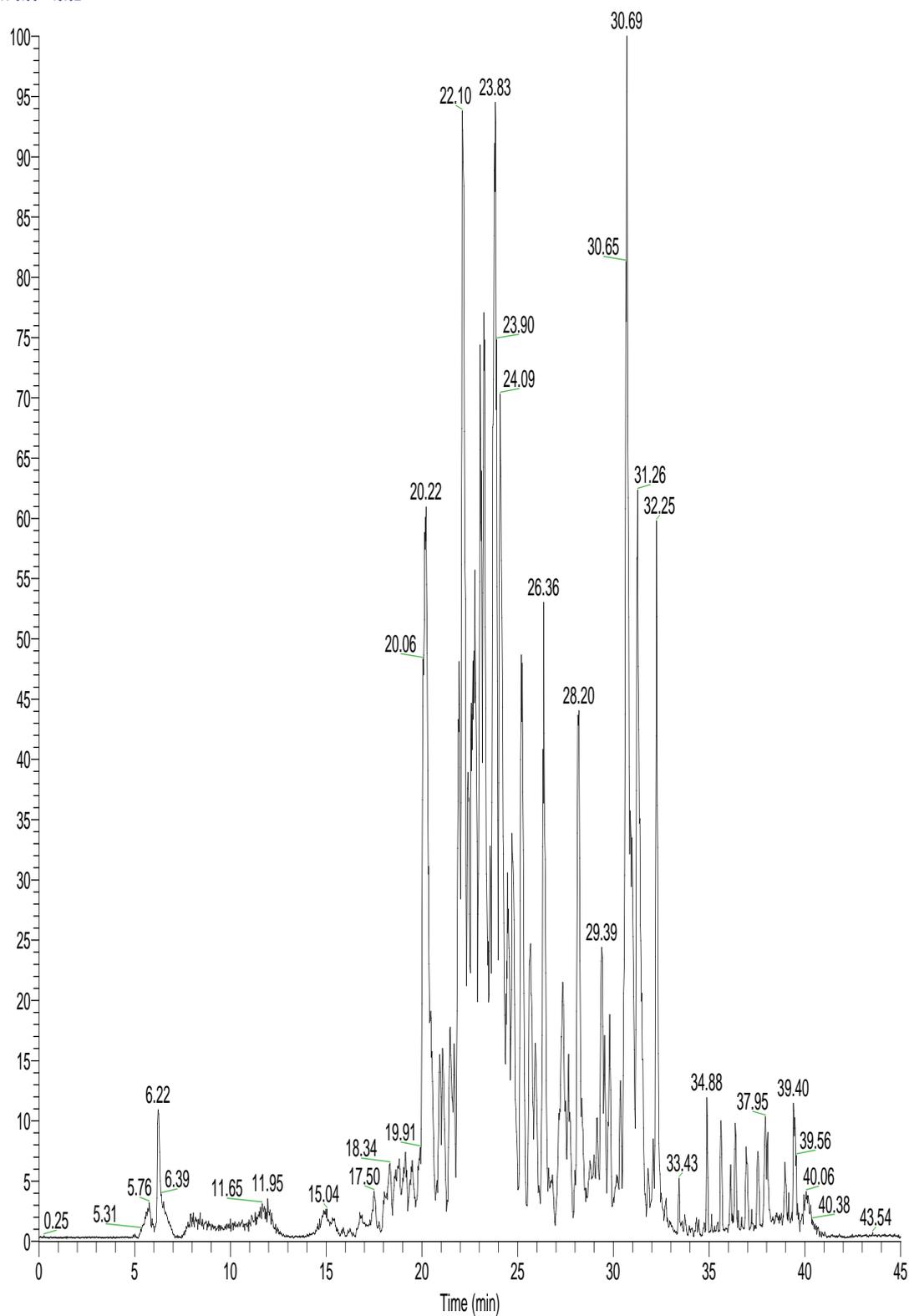


Figure 68. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELT en mode ions négatifs.

RT: 0.00 - 45.03

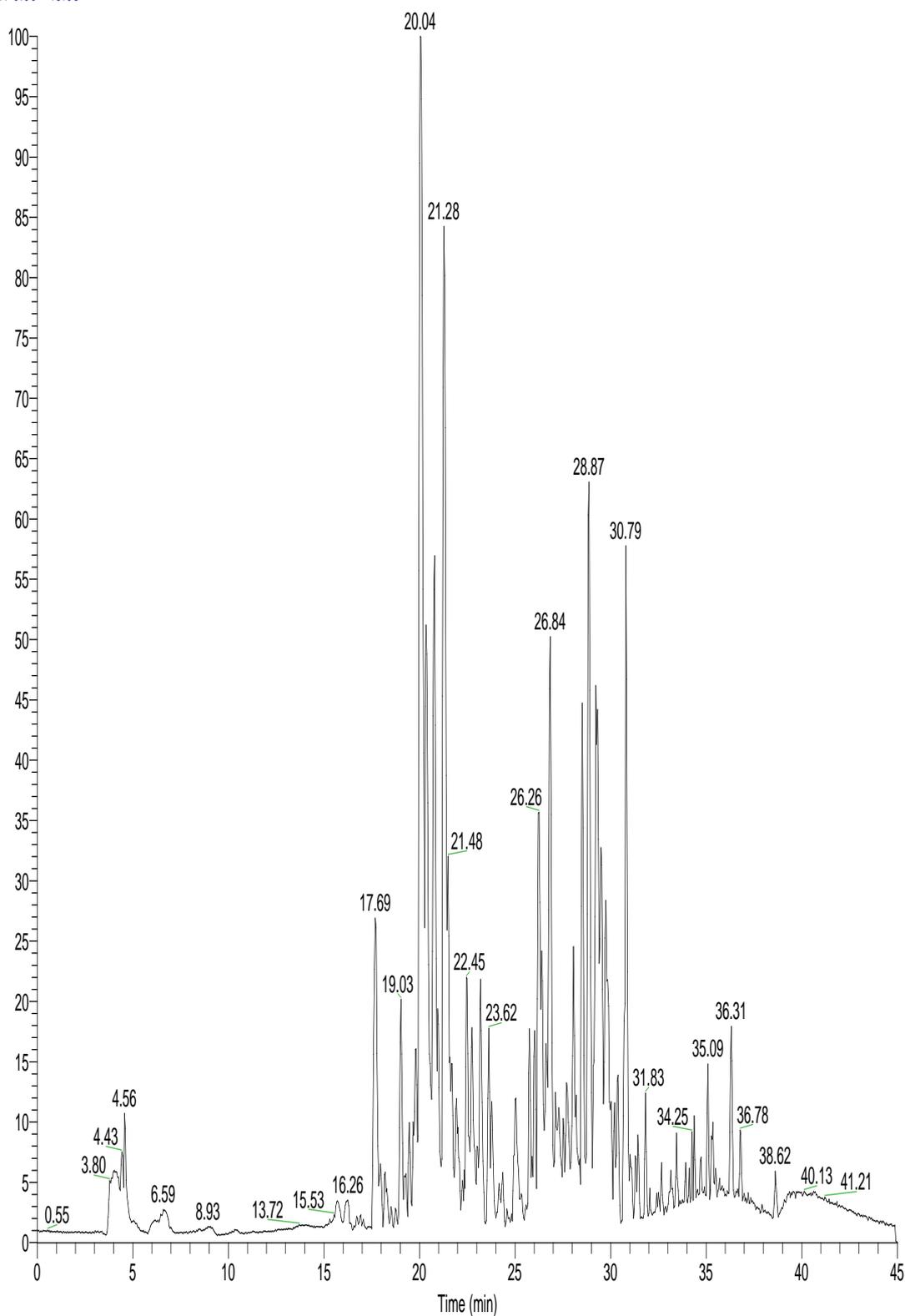


Figure 69. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de l'EAELT en mode ions positifs.

Résultats et discussion

Tableau 16. Composés caractérisés par les analyses LC-RHMS/MS dans l'EAELN et l'EAELT.

No.	Composés	TR (min)	m/z (ion moléculaire)	Intensité (EAELN)	Intensité (EAELT)
1	Mélibiose	4.99	365.1138	147 929 531 (3.97%)	147 978 181 (2.36%)
2	Acide chlorogénique	18.02	355.1008	19 830 953 (0.53%)	466 338 325 (7.44%)
3	Acide cafféoylquinique	18.40	353.0862	2 047 497 (0.05%)	76 620 264 (1.22%)
4	Vicenine-2 isomère1	18.94	595.1646	300 955 606 (8.08%)	219 732 570 (3.50%)
5	Féruloyltyramine	19.07	265.1540	157 369 (0.004%)	0
6	Acide 3- <i>O</i> - coumaroylquinique isomère 1	19.17	339.1057	1 531 302 (0.04%)	77 287 147 (1.23%)
7	Métilotoside	19.20	371.0967	21 984 718 (0.59%)	19 742 885 (0.31%)
8	2''- <i>O</i> - β -D- xylopyranosylorientin	19.70	581.1491	429 950 (0.01%)	253 972 376 (4.05%)
9	Méthyl chlorogénate isomère 1	20.30	369.1171	2 903 253 (0.08%)	185 972 948 (2.97%)
10	Acide 4- cafféoylquinique	20.40	353.0863	32 305 715 (0.87%)	658 912 290 (10.51%)
11	7,2'-Dihydroxyflavone	20.50	253,0708	19 377 588 (0.52%)	7 639 462 (0.12%)
12	Vicenine-2 isomère 2	20.70	593,1488	176 871 262 (4.75%)	2 946 784 (0.05%)
13	Acide 3- <i>O</i> - féruloylquinique isomère 1	21.00	367,1017	1 330 959 (0.04%)	174 112 107 (2.78%)
14	Lanicepside B	21.36	561.1933	683 831 (0.02%)	1 511 690 (0.02%)
15	Olivil 4'- <i>O</i> - β -D- glucoside	21.50	583.2010	2 205 970 (0.06%)	1 187 665 (0.02%)
16	Vicenine-2 isomère 3	21.60	593.1488	173 733 674 (4.67%)	108 801 687 (1.74%)
17	5,3'-Dihydroxyflavone	21.70	253.0708	104 431 411 (2.80%)	30 222 840 (0.48%)

Résultats et discussion

18	Coumaroyl- <i>O</i> - β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside	21.80	487.1436	0	10 332 606 (0.16%)
19	Acide 3- <i>O</i> -coumaroylquinique isomère 2	22.05	337.0916	12 392 332 (0.33%)	290 472 234 (4.63%)
20	Lutéoline-7,3'-di- <i>O</i> - β -D-glucoside	22.10	609.1438	4 642 826 (0.12%)	2 201 017 (0.04%)
21	Vicenine-2 isomère 4	22.40	593.1488	192 586 754 (5.17%)	9 952 840 (0.16%)
22	Chlorogénate de méthyle isomère 2	22.44	369.1171	1 751 179 (0.05%)	2 924 904 (0.05%)
23	Acide 3- <i>O</i> -féruloylquinique isomère 2	22.50	367.1020	3 479 096 (0.09%)	241 714 645 (3.85%)
24	Acide chicorique	22.80	473.0705	305 001 876 (8.19%)	7 778 556 (0.12%)
25	Orientine isomère 1	22.85	449.1066	94 546 115 (2.54%)	138 356 303 (2.21%)
26	<i>cis</i> -Zéatine- <i>O</i> -glucoside	22.86	382.1849	3 651 063 (0.1%)	37 911 888 (0.60%)
27	Homoorientine	23.00	447.0912	207 820 192 (5.58%)	577 624 518 (9.21%)
28	Quercétine-3-méthoxy-3'- <i>O</i> -glucoside isomère 1	23.05	479.1173	40 490 115 (1.09%)	16 892 786 (0.27%)
29	Orientine isomère 2	23.20	447.0914	15 986 955 (0.43%)	24 045 527 (0.38%)
30	2-Phényléthyl 3- <i>O</i> -(4-carboxy-3-hydroxy-3-méthylbutanoyl)- β -D-glucopyranoside	23.40	451.1607	92 875 737 (2.49%)	7 558 907 (0.12%)
31	Tricine 5-glucoside isomère 1	23.45	493.1326	125 814 691 (3.38%)	8 039 417 (0.13%)
32	8-C-Disaccharide génistéine	23.53	565.1543	80 548 (0.002%)	426 027 (0.007%)
33	Acide 4,5-dicafféoylquinique isomère 1	23.70	515.1211	45 099 159 (1.21%)	191 156 967 (3.05%)
34	Chlorogénate de méthyle isomère 3	23.80	367.1020	448 454 (0.01%)	8 051 002 (0.13%)
35	3,4-Diméthoxydalbergione	23.81	285.1220	70 272 437 (1.89%)	20 260 632 (0.32%)

Résultats et discussion

36	Isovitexine	24.10	433.1117	31 735 817 (0.85%)	23 075 317 (0.37%)
37	Vitexine	24.20	431.0966	280 284 714 (7.53%)	183 668 390 (2.93%)
38	Isovitexin 2''-O-arabinoside	24.24	563.1388	42 646 (0.001%)	173 177 (0.003%)
39	Acide 6-(3-Benzoyloxy-2-hydroxypropoxy)-glucuronique	24.36	371.0970	263 066 (0.007%)	309 401(0.005%)
40	Kaempférol-7-O-hexoside	24.40	447.0915	31 103 555 (0.84%)	28 574 403 (0.46%)
41	Swertisine	24.45	445.1131	124 569 (0.003%)	21 234 562 (0.34%)
42	Vitexine-2''-rhamnoside	24.50	577.1544	1 303 151 (0.03%)	797 971 (0.01%)
43	Hyperoside	24.54	463.0864	23 074 096 (0.62%)	242 440 610 (3.87%)
44	Acide 4,5-dicafféoylquinique isomère 2	24.80	515.1175	41 362 870 (1.11%)	222 450 268 (3.55%)
45	Acide Ellagique	24.90	300.9979	309 652 (0.008%)	3 654 427 (0.06%)
46	Violanthine	25.00	577.1542	696 722 (0.02%)	740 181 (0.01%)
47	Rutine	25.00	609.1437	0	365 553 (0.006%)
48	Guajavarine	25.10	433.0761	2 713 340 (0.07%)	27 315 611 (0.44%)
49	Spiraoéside	25.20	463.0858	814 062 (0.02%)	3 077 180 (0.05%)
50	Dihydroinfectopyrone	25.20	267.1197	79 404 224 (2.13%)	15 136 125 (0.24%)
51	Lutéoline	25.37	287.0544	97 253 530 (2.61%)	153 192 910 (2.44%)
52	Acide Rosmarinique	25.40	359.0753	46 168 506 (1.24%)	31 520 285 (0.50%)
53	Malvidine 3-O-β-galactoside	25.44	493.1326	545 776 (0.01%)	1 106 293 (0.02%)
54	Quercétine-3-méthoxy-3'-O-glucoside isomère 2	25.50	477.1020	31 418 799 (0.84%)	24 295 807 (0.39%)
55	5-O-β-D-glucopyranosyl-7-méthoxy-3',4'-dihydroxy-4-phénylcoumarine	25.51	463.1225	1 076 001 (0.03%)	4 154 266 (0.07%)

Résultats et discussion

56	Afzéline	25.52	433.1119	84 417 798 (2.27%)	4 951 453 (0.08%)
57	Lutéoline-7- <i>O</i> - β -D-glucoside	25.74	449.1066	1 673 218 (0.04%)	9 548 581 (0.15%)
58	Quercitine	25.90	447.0913	88 111 709 (2.37%)	210 096 500 (3.35%)
59	Isorhamnétine 3- <i>O</i> - β -D-galactoside	26.00	477.1019	8 038 853 (0.22%)	20 374 345 (0.32%)
60	8,3'4'-trihydroxyflavone-7- <i>O</i> -6(6''- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	26.30	593.1487	75 785 (0.002%)	0
61	Acide 3- <i>O</i> -coumaroylquinique isomère 3	26.32	337.0917	551 064 (0.01%)	69 834 551 (1.11%)
62	Foliasalacioside B1	26.50	527.2462	2 494 169 (0.07%)	2 093 539 (0.03%)
63	Genkwanine	26.59	285.0752	10 742 814 (0.29%)	476 146 (0.008%)
64	Cirsiliol	26.60	331.0804	130 903 808 (3.52%)	516 457 072 (8.24%)
65	Acide 9-(2,3-dihydroxypropoxy)-9-oxononanoïque	26.70	261.1334	4 813 192 (0.13%)	2 570 671 (0.04%)
66	Tricine 5-glucoside isomère 2	26.90	491.1174	16 112 666 (0.43%)	43 903 953 (0.70%)
67	Méthoxy-quercétine-3- <i>O</i> -hexoside	27.40	477.1016	49 158 (0.001%)	0
68	Blumenol C glucoside	27.44	373.2212	5 616 862 (0.15%)	4 813 282 (0.08%)
69	Acide 4-(3,4-dihydroxy-phényl)-6,7-dihydroxy-naphthalène-2-carboxylique	27.70	311.0551	18 083 364 (0.49%)	4 622 489 (0.07%)
70	Phlorhizine	28.00	435.1288	906 364 (0.02%)	36 104 719 (0.58%)
71	Podophyllotoxine-β-D-glucoside	28.10	621.1804	164 285 959 (4.41%)	299 083 (0.005%)
72	Tétrahydroxyflavone	28.40	285.0394	249 356 019 (6.70%)	273 110 205 (4.36%)
73	6,4'-diméthoxy scutellaréine-7-néohespéridiside	29.20	667.1756	0	859 816 (0.01%)
74	Trihydroxyflavone	29.60	269.0404	25 972 811 (0.70%)	4 631 461 (0.07%)

75	3-(2,6-Dihydroxyphényl)-4-hydroxy-6-méthyl benzofuranone	29.80	271.0604	2 623 339 (0.07%)	14 180 305 (0.23%)
76	Lactarorufine A	30.80	265.1453	2 422 100 (0.07%)	26 032 990 (0.42%)
77	12,13-Dihome	33.90	313.2372	1 598 402 (0.04%)	125 993 (0.002%)
78	Acide α -dimorphécolique	34.40	295.2266	9 540 392 (0.26%)	9 397 797 (0.15%)

EAELN, Extrait d'acétate d'éthyle de *L. numidicum*; EAELT, Extrait d'acétate d'éthyle de *L. trigynum*; TR, temps de rétention.

I.6.1.1 Composition phytochimique de l'EAELN et l'EAELT

L'analyse de la composition phytochimique de l'EAELN et l'EAELT a montré la présence de polyphénols, terpénoïdes, alcaloïdes, polykétides, d'acides gras et de glucides.

Les classes les plus importantes sont les flavones (23 composés) et les acides phénoliques (19 composés) (Figure 70).

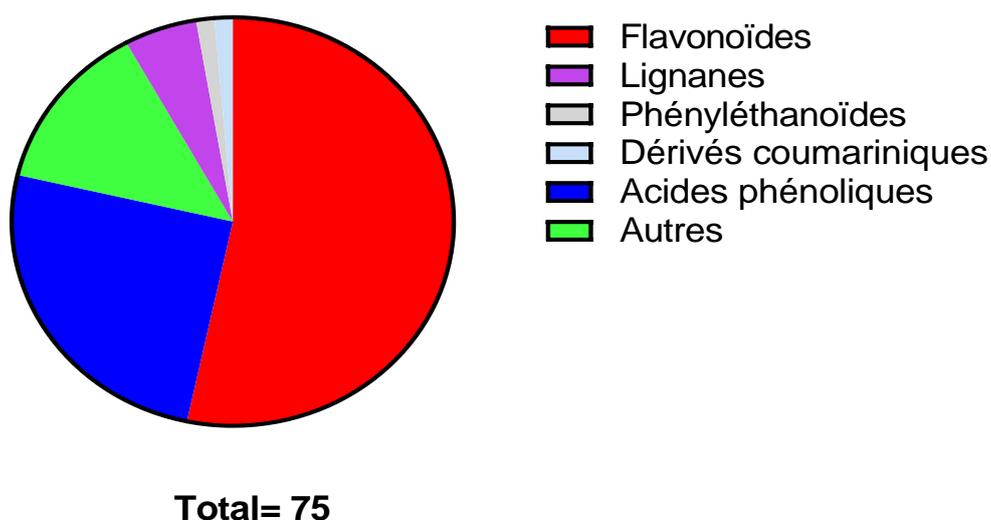


Figure 70. Composition phytochimique de l'EAELN et l'EAELT.

I.6.1.1.1 Composés détectés dans l'EAELN

✓ Flavonoïdes

Quarante flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavones, néoflavoïdes, chalcones et une anthocyanidine) ont été détectés.

Les principaux composés sont la vicenine-2 isomère 1 (**4**), vitexine (**37**), trihydroxyflavone (**74**), l'homoorientine (**27**), vicenine-2 isomère 4 (**21**), vicenine-2 isomère 2 (**12**), vicenine-2 isomère 3 (**16**), cirsiol (**64**), tricine 5-glucoside isomère 2 (**66**), 5,3'-dihydroxyflavone (**17**), lutéoline (**51**), orientine isomère 1 (**25**), avec des pourcentages respectifs de 8,08, 7,53, 6,70, 5,58, 5,17, 4,75, 4,67, 3,52, 3,38, 2,80, 2,61 et 2,54 %.

✓ Lignanes

Quatre lignanes ont été détectés, lanicepside B (**14**), l'olivil 4'-O-glucoside (**15**), phénylnaphtalène (**69**) et le composé majeur podophyllotoxine- β -D-glucoside (**71**) avec un pourcentage de 4,41 %.

✓ Acides phénoliques

Dix-neuf acides phénoliques, parmi lesquels dix-sept acides hydroxycinnamiques et deux acides hydroxybenzoïques ont été détectés avec l'acide chicorique (**24**) comme composé majoritaire (8,19 %).

- Les analyses ont également montré la présence d'un **phényléthanoïde** (**30**) et d'un **dérivé coumarinique** (**55**).

• Autres composés

Outre que les composés phénoliques, un glucide, le mélibiose (**1**), un alcaloïde (**26**), deux polykétides (**50** et **75**), trois terpénoïdes (**62**, **68**, et **76**) et trois acides gras (**65**, **77**, et **78**) ont également été retrouvés (Tableau 16).

I.6.1.1.2 Composés détectés dans l'EAELT

✓ Flavonoïdes

Quarante flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavones, néoflavonoïde, chalcone et anthocyanidine) ont été détectés avec l'homoorientine (**27**), cirsiol (**64**), tétrahydroxyflavone (**72**), 2''-O- β -D-xylopyranosylorientine (**8**), l'hyperoside (**43**), vicenine-2 isomère1 (**4**), quercitrine (**58**) et la vitexine (**37**) comme composés majeurs avec des pourcentages respectifs de 9,21, 8,24, 4,36, 4,05, 3,87, 3,50, 3,35 et 2,93 %.

✓ Lignanes

Les mêmes lignanes (**14**, **15**, **69**, et **71**) que ceux détectés dans l'EAELN ont également été retrouvés dans l'EAELT.

✓ Acides phénoliques

Dix-neuf acides phénoliques ont été détectés (17 acides hydroxycinnamiques et 2 acides hydroxybenzoïques), à savoir l'acide 4-caféoylquinique (**10**), l'acide chlorogénique (**2**), l'acide 3-O-coumaroylquinique isomère 2 (**19**), l'acide 3-O-féruloylquinique isomère 2 (**23**), l'acide 4,5-dicaféoylquinique isomère 2 (**44**), l'acide 4,5-dicaféoylquinique isomère 1 (**33**), et le chlorogénate de méthyle isomère 1 (**9**) avec des pourcentages respectifs de 10,51, 7,44, 4,63, 3,85, 3,55, 3,05 et 2,97 %.

✓ Un **phényléthanoïde** (**30**) et d'un **dérivé coumarinique** (**55**) ont également été détectés dans l'EAELN.

✓ Autres composés

Les mêmes autres composés (**1**, **26**, **50**, **75**, **62**, **68**, **76**, **65**, **77**, et **78**) (Tableau 16), appartenant à différentes classes phytochimiques, qui ont été détectés dans l'EAELN, ont également caractérisé l'EAELT.

I.6.2 Analyses LC-HRMS/MS de F1 et F6

Les analyses LC-HRMS/MS de F1 et F6 ont révélé la présence de 72 et 58 composés respectivement (Tableau 17, Figure 71, 72, 73, 74).

RT: 0.00 - 45.02

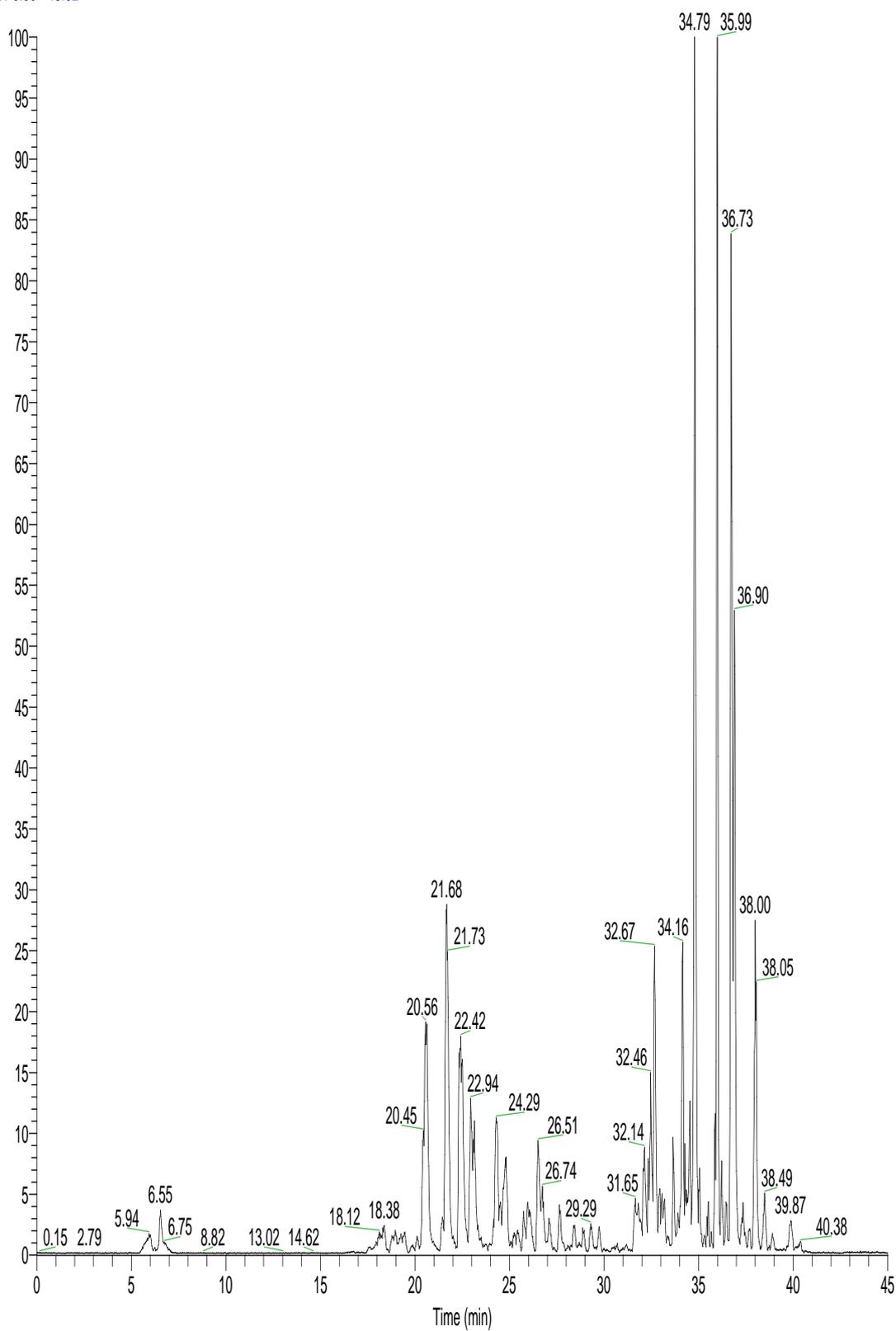


Figure 71. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F1 en mode ions négatifs.

RT: 0.00 - 45.03

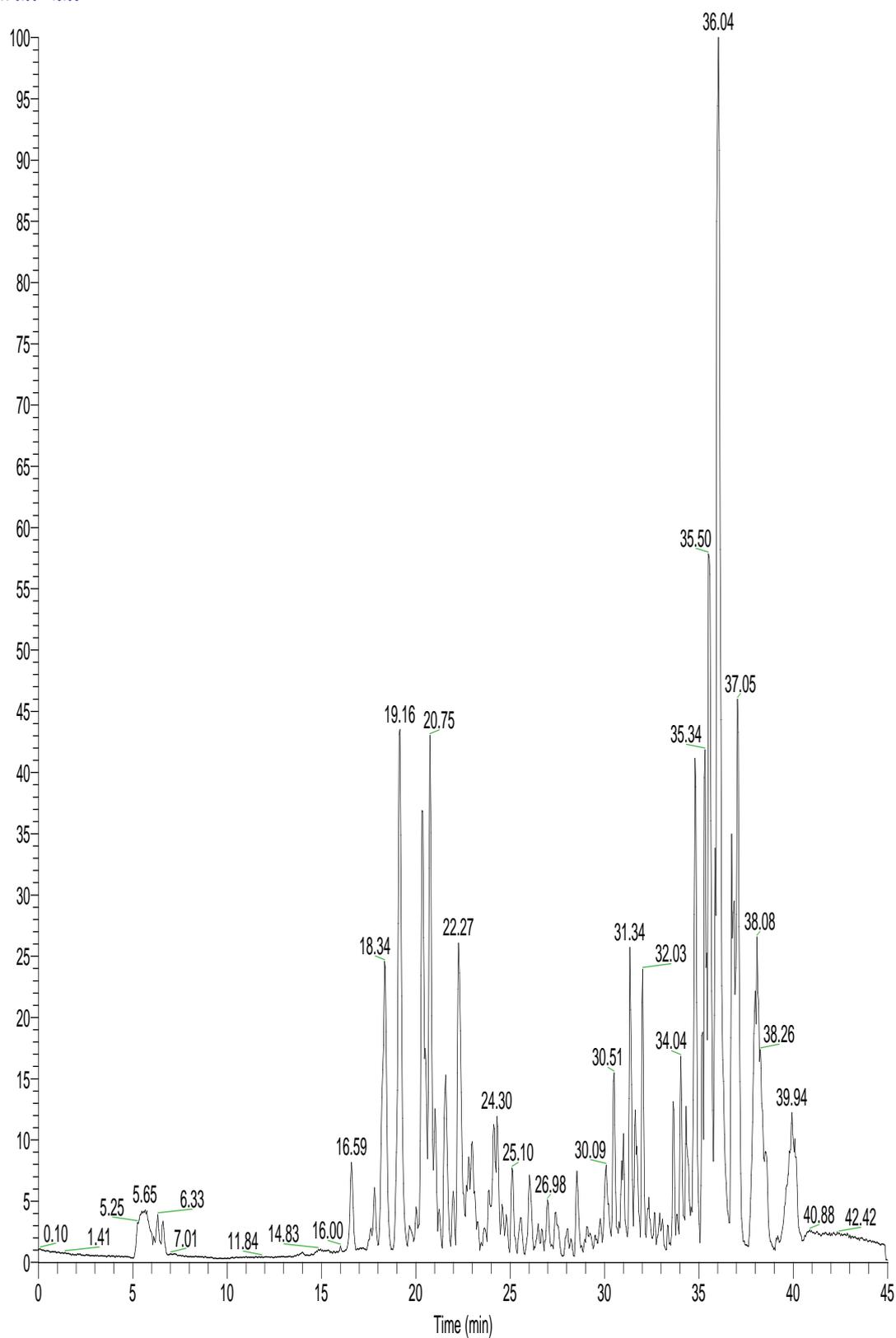


Figure 72. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F1 en mode ions positifs.

RT: 0.00 - 45.02

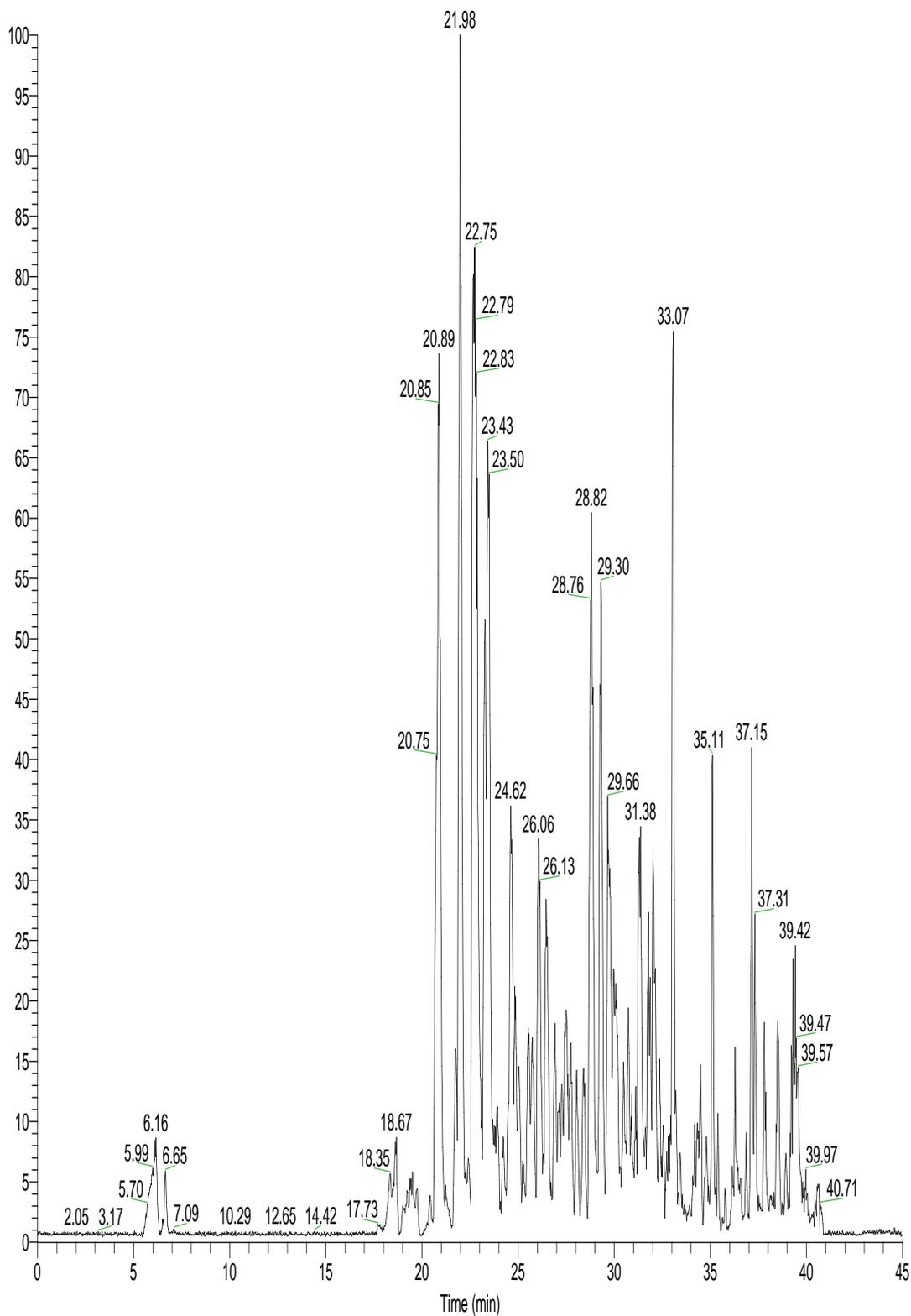


Figure 73. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F6 en mode ions négatifs.

RT: 0.00 - 45.00

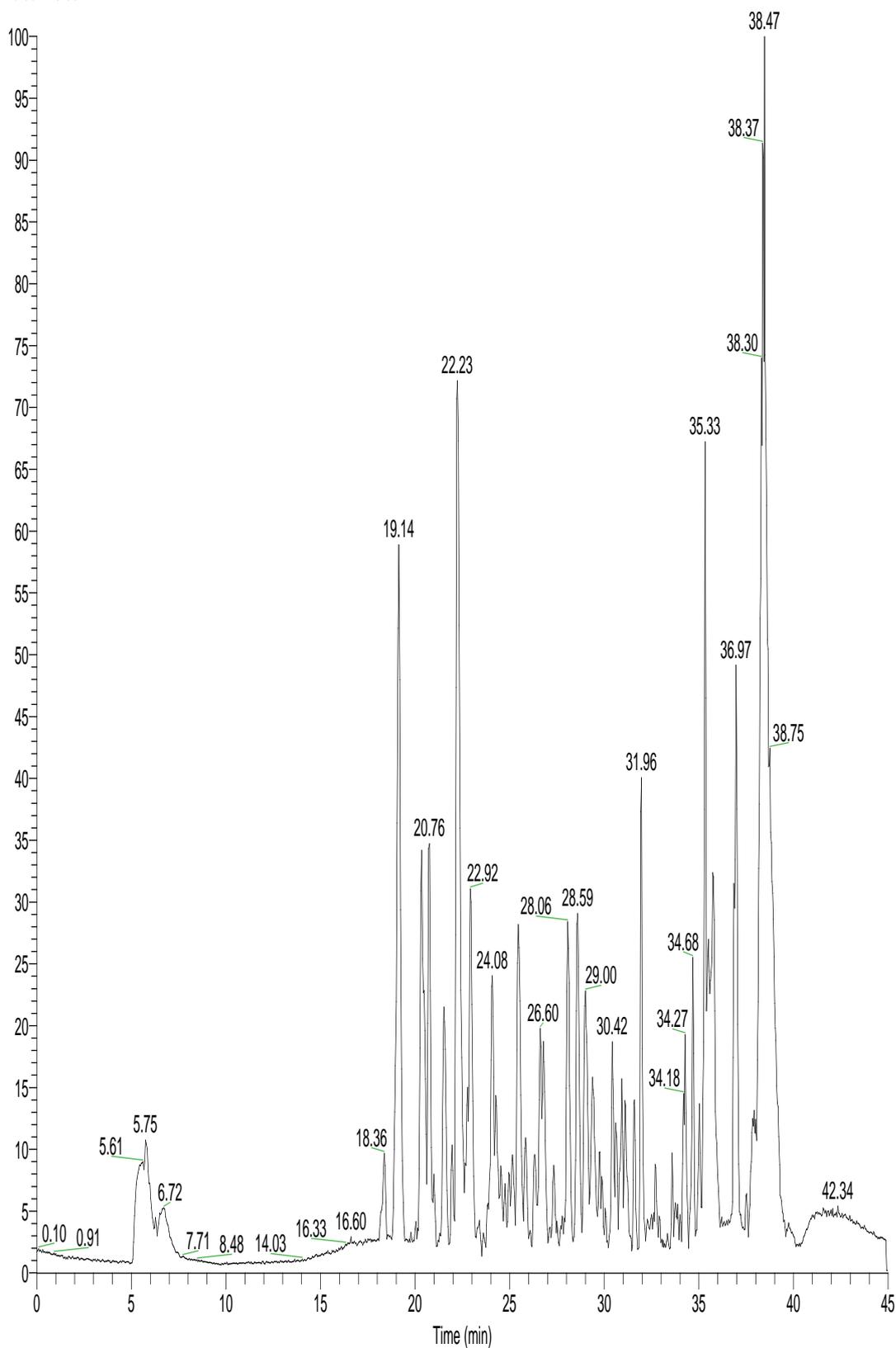


Figure 74. Chromatogramme LC-ESI-DDA-HRMS de F6 en mode ions positifs.

Résultats et discussion

Tableau 17. Composés caractérisés par les analyses LC-RHMS/MS dans F1 et F6 de l'EBLN

No.	Composés	Rt (min)	m/z (ion moléculaire)	Intensité (F1)	Intensité (F6)
1	Melibiose	4.99	365.1138	224 964 (0.0054%)	0
2	Glycérophosphorylcholine	6.08	258.1088	52 901 889 (1.27%)	781 235 (0.03%)
3	Spartéine	17.06	235.2161	1 693 694 (0.041%)	36 486 562 (1.26%)
4	Acide chlorogénique	18.02	355.1008	3 944 674 (0.095%)	130 321 (0.004%)
5	Acide cafféoylquinique	18.40	353.0862	11 944 447 (0.29%)	0
6	Féruoyltyramine	19.07	265.1540	941 969 50 (22.58%)	663 765 985 (22.90%)
7	Acide 3- <i>O</i> - coumaroylquinique isomère 1	19.17	339.1057	59 167 (0.001%)	145 052 (0.005%)
8	Métilotoside	19.20	371.0967	4 939 751 (0.12%)	1 216 300 (0.04%)
9	Acide 4-cafféoylquinique	20.40	353.0863	15 068 963 (0.36%)	607 918 (0.02%)
10	Vicenine-2 isomère 2	20.70	593.1488	288 097 566 (6.91%)	173 755 009 (6%)
11	Acide 3- <i>O</i> - féruoylquinique isomère 1	21.0	367.1017	612 483 (0.01%)	0
12	6,8-di- <i>C</i> - glucosylnaringénine	21.20	595.1656	0	1 302 281 (0.04%)
13	Lanicepside B	21.36	561.1933	24 274 973 (0.58%)	34 728 160 (1.20%)
14	Olivil 4'- <i>O</i> - β -glucoside	21.50	583.2010	36 382 144 (0.87%)	21 254 583 (0.73%)
15	Vicenine-2 isomère 3	21.60	593.1488	350 303 654 (8.40%)	8 441 438 (0.29%)
16	5,3'-Dihydroxyflavone	21.70	253.0708	140 523 (0.003%)	0
17	Acide 3- <i>O</i> - Coumaroylquinique isomère 2	22.05	337.0916	1 073 935 (0.03%)	0
18	Lutéoline-7,3'-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glucoside	22.10	609.1438	11 815 571 (0.28%)	3 654 343 (0.13%)
19	Vicenine-2 isomère 4	22.40	593.1488	335378230 (8.04%)	443150355 (15.29%)
20	Chlorogénate de méthyle isomère 2	22.44	369.1171	254 973 (0.006%)	0
21	Acide 3- <i>O</i> - féruoylquinique isomère 2	22.50	367.1020	1 483 252 (0.036%)	0
22	Acide chicorique	22.80	473.0705	11 194 964	155 176

Résultats et discussion

23	Orientine isomère 1	22.85	449.1066	(0.27%) 155 111 757	(0.005%) 136 412 417
24	<i>cis</i> -Zeatine- <i>O</i> -glucoside	22.86	382.1849	(3.72%) 793 842	(4.71%) 184 768
25	Homoorientine	23.00	447.0912	(0.02%) 145 236 515	(0.006%) 59 726 086
26	Quercétine-3-méthoxy-3`- <i>O</i> -glucoside isomère 1	23.05	479.1173	(3.48%) 4 912 832	(2.06%) 5 679 091
27	Orientine isomère 2	23.20	447.0914	(0.12%) 17 917 636	(0.20%) 157 971 587
28	8-C-Disaccharide génistéine	23.53	565.1543	(0.43%) 735 534	(5.45%) 490 240
29	Acide 4,5- dicafféoylquinique isomère 1	23.70	515.1211	(0.02%) 113 851	(0.017%) 0
30	3,4-Diméthoxydalbergione	23.81	285.1220	(0.003%) 1 256 138	(0.09%) 2 746 522
31	Chlorogénate de méthyle isomère 3	23.83	367.1020	(0.03%) 694 445	(0.09%) 1 295 145
32	Isovitexine	24.10	433.1117	(0.017%) 232 634 512	(0.04%) 250 950 411
33	Vitexine	24.20	431.0966	(5.58%) 126 399 128	(8.66%) 1 102 817
34	Acide 6-(3-Benzoyloxy-2- hydroxypropoxy)- glucuronique	24.36	371.0970	(3.03%) 0	(0.04%) 42 378
35	kaempférol-7- <i>O</i> -hexoside	24.4	447.0915	(0.001%) 19 708 883	(0.001%) 1 048 907
36	Vitexine-2"-rhamnoside	24.47	577.1544	(0.47%) 2 087 269	(0.04%) 32 438 543
37	Hyperoside	24.50	463.0864	(0.05%) 84 754 794	(1.12%) 566 527
38	Acide 4,5- dicafféoylquinique isomère 2	24.80	515.1175	(2.03%) 364 166	(0.02%) 0
39	Acide ellagique	24.90	300.9979	(0.009%) 13 431 485	(0.009%) 0
40	Violanthine	24.97	577.1542	(0.32%) 6 386 162	(0.32%) 7 660 390
41	Rutine	25.0	609.1437	(0.15%) 0	(0.26%) 2 255 008
42	Spiraéoside	25.18	463.0858	(0.08%) 5 968 746	(0.08%) 11 293 525
43	Dihydroinfectopyrone	25.20	267.1197	(0.14%) 764 758	(0.39%) 1 468 997
44	Malvidine 3- <i>O</i> - β - galactoside	25.44	493.1326	(0.02%) 80 279 764	(0.05%) 358 206 055
45	Quercétine-3-méthoxy-3`- <i>O</i> -glucoside isomère 2	25.50	477.1020	(1.92%) 2 312 398	(12.36%) 495 727
46	5- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl- 7-méthoxy-3`,4`-	25.51	463.1225	(0.06%) 5 753 443	(0.02%) 22 257 956
				(0.14%) (0.77%)	

Résultats et discussion

47	dihydroxy-4-phénylcoumarine Afzéliine	25.52	433.1119	3 403 707 (0.08%)	3 938 413 (0.14%)
48	Lutéoline-7-O-β-D-glucoside	25.74	449.1066	33 937 703 (0.81%)	104 955 106 (3.62%)
49	Quercitine	25.90	447.0913	47 002 137 (1.13%)	1 537 286 (0.05%)
50	Ecdystérone	25.95	481.3132	78 203 (0.002%)	0
51	Isorhamnétine 3-O-β-D-galactoside	26.00	477.1019	13 303 497 (0.32%)	8 493 729 (0.29%)
52	8,3`4`-trihydroxyflavone-7-O-6(6``-O-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside	26.30	593.1487	819 878 (0.02%)	877 642 (0.03%)
53	Foliasalacioside B1	26.50	527.2462	1 200 253 (0.03%)	1 972 007 (0.07%)
54	Genkwanine	26.59	285.0752	5 935 182 (0.14%)	192 029 334 (6.63%)
55	Cirsiliol	26.60	331.0804	0	6 126 054 (0.21%)
56	Acide 9-(2,3-dihydroxypropoxy)-9-oxononanoïque	26.70	261.1334	19 266 273 (0.46%)	0
57	Tricine 5-glucoside isomère 2	26.90	491.1174	6 732 748 (0.16%)	2 772 518 (0.1%)
58	Méthoxy-quercétine-3-O-hexoside	27.40	477.1016	56 227 (0.001%)	19 230 674 (0.66%)
59	Blumenol C glucoside	27.44	373.2212	30 499 636 (0.73%)	58 566 246 (2.02%)
60	Dérive d'ester Bis-iridoïde	27.70	789.2796	10 166 795 (0.24%)	0
61	Phlorhizine	28.00	435.1288	465 515 (0.01%)	0
62	Podophyllotoxine-β-D-glucoside	28.10	621.1804	5 931 413 (0.14%)	0
63	Pectolarine	28.21	623.1957	48 257 (0.001%)	5 776 253 (0.20%)
64	Tétrahydroxyflavone	28.40	285.0394	6 080 151 (0.15%)	623 114 (0.02%)
65	Trihydroxyflavone	29.60	269.0404	164 708 (0.004%)	0
66	Géranyl-6-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucoside	30.07	471.2195	2 087 401 (0.05%)	15 115 391 (0.52%)
67	Lactarorufine A	30.8	265.1453	15 293 800 (0.37%)	33 441 (0.001%)
68	Acide oléanolique	32.23	439.3562	96 355 154 (2.31%)	6 381 913 (0.22%)
69	Anchusoside 7	32.35	965.5068	105 276 437	4 987 873

Résultats et discussion

70	Dérivé d'acide dropicène-3-yl-2-carboxylique	33.10	793.4353	(2.52%) 50 718 652 (1.22%)	(0.17%) 177 606 (0.006%)
71	12,13-DiHOME	33.90	313.2372	(1.23%) 51 383 695	(0.03%) 786 289
72	Acide α -dimorphécolique	34.40	295.2266	(0.79%) 32 818 236	(0.008%) 241 949
73	Acide roccellique	35.50	299.2005	(0.15%) 6 119 093	0
74	Acide 5,6-déhydroarachidonique	35.70	301.2161	(0.18%) 7 376 397	0
75	Palmitamide	35.80	256.2627	(9.18%) 383 086 674	(0.04%) 1 225 592
76	Oléamide	40.87	282.2783	(5.62%) 234 329 621	(0.64%) 18 527 386

F, Fraction ; EBLN, Extrait butanolique de *L. numidicum*; TR, temps de rétention.

I.6.2.1 Composition phytochimique de F1 et F6

F1 et F6 ont montré la présence de polyphénols, de terpénoïdes, d'alcaloïdes, de polykétides, d'acides gras et de glucides.

Les flavonides (32 composés ont été détectés dans F1 et F6) et les acides phénoliques (15 composés dans F1 et 8 dans F6) sont les classes les plus importantes (Figure 75 et 76).

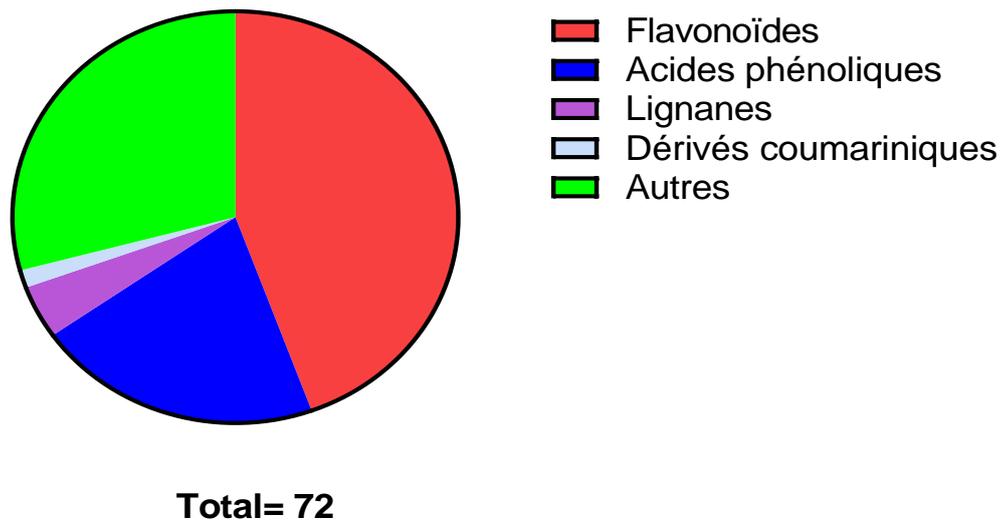


Figure 75. Composition phytochimique de F1.

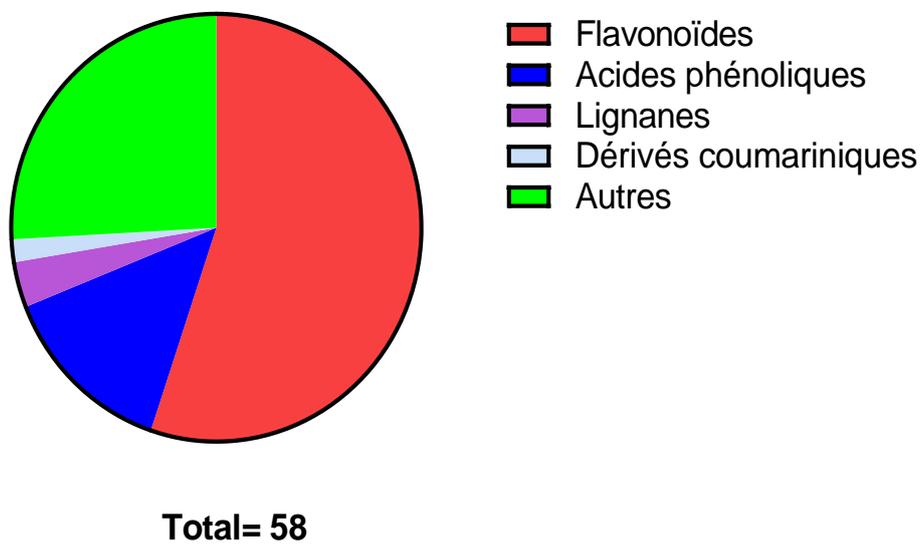


Figure 76. Composition phytochimique de F6.

I.6.2.1.1 Composés détectés dans F1

✓ Trente-deux flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavones, néoflavoïdes, chalcones, et une anthocyanidine) ont été détectés dans F1. Les principaux composés sont vicenine-2 isomère 3 (**15**), vicenine-2 isomère 4 (**19**), vicenine-2 isomère 2 (**10**), l'isovitexine (**32**), l'orientine isomère 1 (**23**), l'homoorientine (**25**), et la vitexine. (**33**) avec des pourcentages respectifs de 8.4, 8.01, 6.91, 5.58, 3.72, 3.48, et 3.03 % (Tableau 9).

Trois lignanes, lanicepside B (**13**), olivil 4'-*O*-glucoside (**14**), et la podophyllotoxine- β -D-glucoside (**62**) ont été détectés.

✓ De plus, 15 acides phénoliques ont été détectés avec la féruloyltyramine (**6**) comme composé majoritaire (22.58 %).

✓ Les analyses ont également montré la présence d'un dérivé coumarinique (**46**), outre d'autres composés dont un glucide, le mélibiose (**1**), 2 alcaloïdes (**3** et **24**), un polykétide (**43**), 9 terpénoïdes (**50**, **53**, **59**, **60**, **66**, **67**, **68**, **69**, et **70**), et 8 acides gras ont été détectés. Le palmitamide (**75**) et l'oléamide (**76**) sont les principaux composés avec des pourcentages de 9.18 et 5.62 % respectivement.

I.6.2.1.2 Composés détectés dans F6

✓ Trente-deux flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavones, néoflavoïde, chalcone et anthocyanidine) ont été détectés dans F6 avec vicenine-2 isomère 4 (**19**), malvidine 3-*O*-galactoside (**44**), isovitexine (**32**), genkwanine (**54**), vicenine-2 isomère 2 (**10**), orientine isomère 2 (**27**), orientine isomère 1 (**23**) et lutéoline-7-*O*- β -D-glucoside (**48**) comme composés majoritaires avec des pourcentages respectifs de 15,29, 12,36, 8,66, 6,63, 6, 5,45, 4,71 et 3,62 % respectivement.

✓ Les 2 mêmes lignanes (**13** et **14**) que ceux détectés dans F1 ont également été trouvés dans F6.

✓ Huit acides phénoliques ont été détectés, la féruloyltyramine (**6**) a également été détectée comme composé majoritaire (22,9 %) en F6.

✓ Les mêmes autres composés (46, 3, 24, 43, 53, 59, 66, 67, 68, 69, 2,70, 71, 72, 75 et 76) appartenant à différentes classes phytochimiques, qui ont été détectés dans F1 ont également été caractérisés la F6.

II. Discussion

Les résultats de l'activité antioxydante obtenus en utilisant plusieurs méthodes (DPPH, ABTS, CUPRAC, phénanthroline, et GOR) ont montré que l'EAELN est plus antioxydant que l'EAELT surtout dans les tests DPPH ($IC_{50} = 11.10 \pm 0.01$), ABTS ($IC_{50} = 8.28 \pm 0.12$) et GOR ($IC_{50} = 10.40 \pm 0.05$) comparativement aux standard BHT et BAT, cela pourrait s'expliquer par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes qui ont été identifiés par LC-HRMS/MS (différence de concentration dans les deux extraits).

Les résultats ont montré une relation étroite entre l'activité antioxydante et la teneur totale en composés phénoliques. En effet, les composés phénoliques sont considérés comme les composés les plus efficaces comme antioxydants, en raison de leur capacité à donner un atome d'hydrogène ou un électron aux radicaux libres. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des études antérieures où l'activité de piégeage des radicaux libres s'est avérée être en bonne corrélation avec le contenu phénolique (Boudermine et al., 2015; Gali & Bdjou, 2019).

Les composés phénoliques ayant une activité antioxydante très élevée peuvent réduire le risque des maladies neurodégénératives causées par le stress oxydatif comme la maladie d'Alzheimer (Dzoyem et al., 2017).

l'EAELN et l'EAELT présentent une faible activité anticholinestérase par rapport au standard galantamine (Tableau 13), cela pourrait s'expliquer par un aspect quantitatif inférieur au seuil critique des molécules qui possèdent des effets anticholinestérasiques, et également par la prédominance de composés glycosylés dans nos extraits tels que la quercétine-3-méthoxy-3'-*O*-glucoside, lutéoline-7-*O*- β -D-glucoside, lutéoline-7,3'-di-*O*- β -D-glucoside, kaempférol-7-*O*-hexoside, ect....).

Yener, et al., (2020) ont montré que les formes aglycones des flavonoïdes exercent une activité inhibitrice élevée de l'AChE et de la BChE, cependant, les composés glycosylés n'étaient pas actifs vis-à-vis l'AChE et BChE, tels que la forme glycoside de la quercétine, le composé rutine (quercétine 3-rutinoside), lutéoline, l'apigénine, kaempférol et d'autres flavonoïdes aglycones. En plus de cela, les poids moléculaires des composés sont également liés à l'activité inhibitrice de l'AChE et BChE. Le poids moléculaire de la galantamine, utilisée comme médicament chez les patients atteints d'Alzheimer au stade léger, est de 287 Da. Les acides phénoliques ayant un poids moléculaire inférieur à 200 Da ont présenté une activité antioxydante, mais une activité inhibitrice plus faible de l'AChE et du BChE. Une corrélation a été observée entre le potentiel antioxydant et les activités anti-AChE et BChE si les poids moléculaires des flavonoïdes aglycones dépassent 300 Da.

Les flavonoïdes glycosidiques dont le poids moléculaire est supérieur 400 Da ont présenté une activité antioxydante élevée mais une activité inhibitrice plus faible de l'AChE et de la BChE. Les flavonoïdes glycosidiques rencontrent un encombrement stérique dans le site actif de l'enzyme. Par conséquent, les poids moléculaires des composés sont un facteur essentiel de leurs activités inhibitrices de l'AChE et de la BChE (Yener, et al., 2020).

L'effet antiprolifératif induit par l'EAELN et de l'EAELT pourrait être dû à la présence de polyphénols tels que les flavonoïdes (53,33%), les acides phénoliques (25,33%), et les lignanes (3%) et/ou au autres composés non phénoliques (9%) dans les extraits AcOEt des deux espèces de *Linum* étudiées (Tableau 16).

Des études récentes ont démontré que les composés phénoliques inhibent la prolifération des cellules cancéreuses, bloquent le cycle cellulaire et induisent la mort cellulaire programmée par différent mécanisme notamment, par la régulation à la baisse des kinases de survie telles que PI3K et Akt, les régulateur de prolifération cellulaire qui comprennent les cyclines de type D, cyclines dépendantes des kinases qui régulent le cycle cellulaire et les protéines kinases Erk1/2 inhibant ainsi les cascades de signalisation oncogène contrôlant la prolifération et également des facteurs de transcriptions tels que NF- κ B, NRF2 et STATs, les facteurs angiogéniques FGFR1, VEGF et MIC-1, également les enzymes histone-désacétylases HDAC1 et HDAC2 qui jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression génétique. De plus, les composés phénoliques pourraient élever l'expression des protéines supprimeurs de tumeurs p53, p21, p27 et PTEN et réguler les niveaux des ROS régulant ainsi la prolifération et la survie et l'apoptose des cellules cancéreuses. L'élévation des niveaux

ROS déclenchée par les polyphénols (effet pro-oxydant) est une stratégie viable pour contrôler la prolifération des cellules cancéreuses et déclencher la mort cellulaire par l'induction des lésions tissulaires en réagissant avec les groupements sulfhydryles des protéines, des lipides membranaires, des nucléotides et par réticulation/fragmentation des ribonucléoprotéines. Les polyphénols pourraient également améliorer la capacité à se différencier et à se transformer en cellules normales (Anantharaju et al., 2016).

Les composés phénoliques sont également connus pour moduler l'expression de protéines clés telles que BCL, BAX, AKT et STAT.

De plus, les flavonoïdes sont également de bons agents anti-prolifératifs. Cet aspect de la protection des flavonoïdes peut être dû en partie à une large gamme d'inhibition enzymatique par exemple, kinases, enzymes pro-oxydantes, ainsi qu'à la régulation de cycle cellulaire et de l'apoptose (Depeint et al., 2002).

Les lignanes et les néo-lignanes sont également une catégorie de métabolites secondaires polyphénoliques qui représentent une classe importante de composés impliqués dans les recherches sur le cancer (Ayres et al., 2008). De nombreux lignanes naturels ont montré des activités, antioxydantes, antimitotiques, antiœstrogéniques, antiangiogéniques, anti-rhumatismales, antipsoriasis, antiasthmatiques, hypolipidémiques, antifongiques et antivirales (Ayres & Loike 1990; Iwasaki et al. 1996; Teodor et al., 2020).

Par conséquent, l'étude actuelle suggère que l'activité antiproliférative exercée par les deux extraits de *Linum* pourrait être due aux composés phénoliques majoritaires détectés.

L'EAELN a manifesté l'activité antiproliférative la plus élevée contre les deux lignées testées PC3 ($IC_{50} = 133,2 \pm 5,73 \mu\text{g/mL}$) et MDA-MB-231 ($IC_{50} = 156,9 \pm 2,83 \mu\text{g/mL}$) (Tableau 14), ce qui pourrait être dû à la différence de contenu phytochimique et de leur concentration dans les deux extraits.

L'utilité des extraits bruts contenant un mélange de composés phénoliques dépend de la quantité de chaque composé phénolique dans l'extrait qui peut varier d'une espèce à une autre et de la méthode d'isolement et de fractionnement. De plus, l'effet de chaque extrait est largement influencé par l'interaction de ces composés. L'effet synergique de plusieurs composés dans un extrait est important.

F1 et F6 ont également inhibé la prolifération des cellules PC3 et MDA-MB 231 de manière dose-dépendante (Tableau 15), cela pourrait également s'expliquer par leur richesse en flavonoïdes (44.44% et 55.17%, respectivement), et en acides phénoliques (20.83% et 13.79, respectivement) (Figure 75 et 76).

Les résultats de l'analyse statistique de l'activité antiproliférative ont montrés que les deux extraits (EAELN et EAELT) induisent des effets identiques sur les deux lignées cellulaires (pas de différence significative) et que par ailleurs les fractions sélectionnées (1 et 6) ont également produit des résultats comparables. Nous avons donc fait l'hypothèse que le mécanisme d'action était le même et on s'est focalisé sur une ligné (PC3) pour la cytométrie en flux.

Les résultats de l'activé apoptotique ont montré que l'EAELN, l'EAELT, F1 et F6 induisent l'apoptose des cellules PC3. L'effet apoptotique induit peut être attribué à leurs principaux composés bioactifs et aux autres composés détectés par un effet direct et/ou synergique (Tableau 16 et 17). L'induction de l'apoptose est connue pour être une stratégie prometteuse pour traiter et contrôler ou éventuellement de mettre fin à la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses car elle n'est pas spécifique à la cause et au type de cancer (Schulze-Bergkamen et Kramer 2004).

Le cycle cellulaire joue un rôle primordial dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses et la dérégulation du cycle cellulaire est une caractéristique fondamentale des cancers (Otto et Sicinski 2017; Vermeulen et al. 2003).

La dérégulation du cycle cellulaire et l'apoptose sont des événements étroitement liés, la perturbation de la progression du cycle cellulaire peut conduire à la mort apoptotique en cas de dommages graves à l'ADN (Kang et al., 2010).

Les points de contrôle du cycle cellulaire jouent un rôle crucial dans la préservation de l'ADN génomique contre les erreurs qui peuvent survenir lors de la répliation de l'ADN et de la ségrégation des chromosomes (Nyberg et al., 2002). L'arrêt du cycle cellulaire à un point de contrôle spécifique et l'induction de l'apoptose, est le mécanisme normal des agents cytotoxiques dans les cellules cancéreuses (Li et al., 2016).

Les produits naturels pouvant perturber le cycle cellulaire sont les médicaments anticancéreux les plus couramment utilisés (Paier et al. 2018).

Par conséquent, la capacité de l'EAELN et de l'EAELT à bloquer le cycle cellulaire des cellules PC3 a été examinée. Nos résultats ont montré que l'EAELN induit un arrêt significatif du cycle cellulaire dans la phase G2/M (Figure 62 et 63), tandis qu'un arrêt dans les phases G0/G1 et G2/M a été observé dans les cellules PC3 après exposition à diverses concentrations d'EAELT (Figure 64 et 65). Ce qui indique que le mécanisme par lequel l'EAELN et l'EAELT empêchent la prolifération des cellules PC3 est l'inhibition de la progression du cycle cellulaire.

Nos résultats soutiennent l'idée que les extraits inhibent la prolifération des cellules cancéreuses en inhibant la progression du cycle cellulaire, ce qui soulève la possibilité que les extraits puissent être un agent thérapeutique potentiel.

L'arrêt en phase G0/G1 conduit les cellules à subir une réparation ou à suivre la voie de l'apoptose (Mantena et al., 2006). Dans le cas des cellules PC3 traitées par l'EAELN et EAELT, les cellules suivent la voie de l'apoptose et répondent aux effets cytotoxiques de l'EAELN et l'EAELT. De plus, le cycle cellulaire des mammifères est géré avec précision par des points de contrôle du cycle cellulaire qui permettent de progresser dans le cycle cellulaire ou d'arrêter les cellules dans la phase G2/M en réaction aux dommages à l'ADN pour le réparer.

Les résultats de l'activité anticancéreuse sont en accord avec ceux obtenus des études antérieures réalisées sur le genre *Linum*, par exemple, une étude a montré que les extraits de *L. album* pourraient être un bon candidat pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses en particulier celles du cancer gastrique (AGS) en modulant la cytotoxicité et en induisant l'apoptose dans les cellules AGS par la régulation à la baisse de l'expression du gène ZNF703 (Akbari Asl et al., 2018), il a également été rapporté que *L. album* exerçait une activité antitumorale et cytotoxique contre les cellules de la leucémie de souris P-388 et la lignée cellulaire 9KB provenant d'un carcinome humain de nasopharynx, les lignanes, podophyllotoxine, 3' déméthylpodophyllotoxine et α - et β -peltatines sont avérés au moins partiellement responsables de l'activité antitumorale et cytotoxique des extraits de *L. album* (Weiss et al., 1975). Une étude a également rapporté que l'extrait (CH₂Cl₂:MeOH) de racine de *L. scabrellum* présente une activité cytotoxique contre quatre lignées cellulaires, colon (HF6), sein (MCF7), prostate (PC3) et les cellules de cancer cervical humain (SiHa), le composé 6-méthoxy-podophyllotoxine était responsable de l'activité observée (Alejandre-García et al. 2015). Une autre étude a montré que *L. persicum* cultivée à l'état sauvage en Iran

exerce une activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires (K562, Jurkat, Fen, A549), les lignées leucémiques K562 et Jurkat étaient les lignées les plus sensibles, l'effet induit peut être dû à l'induction de l'apoptose (Amirghofran et al. 2006). Il a également été rapporté que les fractions CHCl_3 et MeOH des feuilles de *L. grandiflorum* Desf. présentaient une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire EL4 (leucémie murine) (Mohammed et al. 2010). Vatan et al., (2017) ont également montré que les extraits méthanoliques de feuilles et de fruits de *L. arboreum* inhibaient la prolifération des cellules cancéreuses pulmonaires humaines (A549) avec de faibles valeurs d' IC_{50} . De plus, les extraits de *L. linearifolium* réduisent la viabilité cellulaire d'une manière dose-dépendante d'un panel de lignées cellulaires cancéreuses, lignées cellulaires dérivées de la leucémie myéloïde chronique K-562 et LAMA-84, lignées dérivées du lymphome hodgkinien HD-MY-Z et cellules EJ dérivées du carcinome de la vessie humaine. La lignée LAMA-84 est avérée la plus sensible. La puissance des extraits de *L. linearifolium* étant comparable et même supérieure à celle de référence (l'étoposide) (Ionkova et al., 2010). L'extrait méthanolique des parties aériennes de *L. persicum* Kotschy ex Boiss. a montré une cytotoxicité plus élevée contre la lignée K-562, les lignées de Jurkat et A5 (carcinome pulmonaire) (Javidnia et al., 2005). L'extrait méthanolique de *L. narbonense* et *L. leonii* ont tous deux montré une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire leucémique humaine SKW-3. *L. narbonense* a montré un effet cytotoxique sur les lignées leucémiques cellulaires DoHH-2 et HL-60 (Vasilev & Ionkova, 2005).

Fait intéressant, bien que les deux espèces appartiennent au même genre, les effets antioxydant et anticancéreux de l'EAELN étaient supérieurs à ceux de l'EAELT.

Le profil phytochimique de l'EAELN et l'EAELT a montré la présence de composés connus pour leurs activités antioxydante et anticancéreuse

Les effets antioxydant et anticancéreux présentés par l'EAELN et l'EAELT dans notre étude sont peut être dus à la présence de composés spécifiques qui ont été précédemment rapportés dans la littérature pour leur capacité à piéger les radicaux libres, bloquer le cycle cellulaire, induire l'apoptose, et inhiber la prolifération des cellules cancéreuses.

Les activités antioxydante et anticancéreuse induites par l'EAELN pourraient être dues aux principaux composés détectés, à savoir l'acide chicorique (8,19 %), vicénine-2 isomère 1 (8,08 %), vitexine (7,53 %), trihydroxyflavone (6,70 %), homoorientine (5,58 %), vicénine-2 isomère 4 (5,17 %), vicénine-2 isomère 2 (4,75 %), vicénine-2 isomère 3 (4,67 %),

podophyllotoxine- β -D-glucoside (4,41 %), mélibiose (3,97 %), cirsiolol (3,52 %), tricine 5-glucoside isomère 1 (3,38 %), 5,3'-dihydroxyflavone (2,80 %), lutéoline (2,61 %) et isomère 1 d'orientine (2,54 %) (Tableau 16 et Figure 66, 67).

De même, les activités antioxydante et anticancéreuse induites par l'EAELT pourraient être dues à la présence de composés majoritaires, à savoir l'acide 4-caféoylquinique (10,51 %), homoorientine (9,21 %), cirsiolol (8,24 %), l'acide chlorogénique (7,44 %), 3-O-acide coumaroylquinique isomère 2 (4,63%), tétrahydroxyflavone (4,36%), 2''-O- β -D-xylopyranosylorientine (4,05%), hyperoside (3,87%), acide 3-O-féruloylquinique isomère 2 (3,85%), acide 4,5-dicaféoylquinique isomère 2 (3,55 %), vicénine-2 isomère 1 (3,50 %), quercitrine (3,35 %), acide 4,5-dicaféoylquinique isomère 1 (3,05 %), chlorogénate de méthyle isomère 1 (2,97 %), et vitexine (2,93 %) (Tableau 16 et Figure 68, 69).

Les effets antioxydant et anticancéreux de l'EAELN étaient supérieurs à ceux de l'EAELT, ceci pourrait s'expliquer par sa richesse en acide chicorique (8,19%), vicénine-2 isomère 1 (8,08%), vitexine (7,53%), et podophyllotoxine- β -D-glucoside (4,41%) par rapport à l'EAELT qui présente des taux plus faibles de ces composés connus pour leurs activités antioxydante et anticancéreuse, et/ou à d'autres composés présents dans l'extrait qui peuvent agir comme agents antioxydant et anticancéreux. .

De plus, la présence de ces composés dans EAELT peut exercer le potentiel antioxydant et anticancéreux de manière synergique.

L'acide chicorique, possède de nombreuses fonctions bioactives, une propriété élevée de piégeage des radicaux libres, protection du collagène contre la dégradation induite par les radicaux libres, activité anti-hyaluronidase, activité antivirale, l'inhibition de l'intégrase et de la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1, et promouvoir la phagocytose *in vitro* et *in vivo* (Barnes et al., 2005 ; Bauer & Wagner, 1991; Pellati et al., 2004).

En effet, il a été également rapporté que l'acide chicorique a un fort effet inhibiteur de la croissance contre les cellules cancéreuses du côlon HCT-116 en diminuant l'activité de télomérase, qui maintient la stabilité des génomes, et en induisant l'apoptose, caractérisée par la fragmentation de l'ADN, l'activation de la caspase-9, le clivage PARP et la régulation négative de la β -caténine (Tsai et al. 2012). Son activité anticancéreuse sur la lignée cellulaire MCF-7 a également été notée (Huntimer et al. 2006).

Il a également été rapporté que la vicenine-2 possède de nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment des effets antioxydant, hépatoprotectif, anti-inflammatoire et anticancéreux (Ku & Bae 2016; Yang et al. 2018).

Des études menées par Nagaprashantha et ses collaborateurs (2011) ont également montré que la vicenine-2 induit une inhibition antiangiogénique, pro-apoptotique et antiproliférative des cellules cancéreuses de la prostate (PC3, DU-145, et LNCaP), le mécanisme moléculaire du potentiel anticancéreux de la vicenine-2 dans le carcinome des cellules de la prostate (PC-3, DU-145, et LNCaP) est révélé par l'inhibition de la voie EGFR/Akt/mTOR/p70S6k diminuant ainsi le cMyc, la cycline D, la cycline B1, CDK4 et PCNA. La vicenine-2 inhibe également la prolifération des cellules cancéreuses du côlon HT-29 d'une manière dépendante du temps et de la concentration en inhibant la voie de signalisation WNT/ β -caténine, induisant l'apoptose et conduisant à l'arrêt des cellules HT-29 en phase G2/M en raison du niveau accru de cycline B et d'une diminution du niveau de cycline D1. De plus, le traitement à la vicenine-2 augmente l'expression des protéines associées à l'apoptose BAX, cytochrome c et la caspase-3, et diminue celle de BCL-2 (Yang et al. 2018).

La vitexine est un flavonoïde naturel qui présente divers effets pharmacologiques, antioxydant, anti-inflammatoire (An et al. 2012; Bhardwaj et al., 2018), anticholinestérase (Sheeja Malar et al., 2017), antibactérien (Quílez et al., 2010; Das et al., 2016), antiviral (Fahmy et al., 2020), antinociceptif (Borghet et al., 2013), hépatoprotecteur (Kim et al., 2004), cardioprotecteur (Dong et al., 2013), neuroprotecteur (Yang et al., 2014, Hosseinzadeh & Nassiri-Asl, 2017), et anticancéreux (Zhu et al. 2016). Présente une activité antioxydante différentielle contre divers radicaux et joue un rôle dans l'atténuation des dommages induits par le stress oxydatif et le maintien de l'homéostasie redox cellulaire (Khole et al., 2016).

Récemment, la vitexine a attiré l'attention de nombreux chercheurs pour ses propriétés antitumorales potentielles. Ce composé a montré un effet antitumoral contre divers cancers, notamment les cancers du sein, de la prostate et des ovaires, en inhibant la prolifération et en favorisant l'apoptose des cellules cancéreuses (Ganesan & Xu, 2017 ; He et al., 2016; Zhou et al. 2009). Zhou et al. (2009) ont rapporté que la vitexine inhibait la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate, du sein et des ovaires et induisait l'apoptose en activant les caspases, clivage de la protéine PARP et en diminuant le rapport Bcl-2/Bax. Il a été démontré que la vitexine induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et l'apoptose en affectant la

voie de signalisation Akt/mTOR dans les cellules de glioblastome humain et le carcinome pulmonaire non à petites cellules (Liu et al. 2019; Zhang et al. 2018).

La vitexine a montré un effet cytotoxique contre la lignée cellulaire de cancer du côlon résistante aux médicaments HCT-116DR en inhibant l'autophagie et en induisant l'apoptose d'une manière dose-dépendante. Le traitement à la vitexine augmentait les niveaux de membres proapoptotiques Bcl-2 (BAX et BID) et favorisait le clivage de la caspase-3, entraînant ainsi l'induction de l'apoptose (Bhardwaj et al., 2018). La vitexine induit également l'apoptose dans les cellules cancéreuses du côlon et empêche la croissance cellulaire ; et entraîne les cellules leucocytémiques (U937) dans l'apoptose en raison de ses effets sur les voies de signalisation mitochondriale (Aslam et al., 2015).

Une étude a démontré que la vitexine inhibe la survie et l'invasion tumorale des cellules de carcinome hépatocellulaire (HCC) en supprimant la voie STAT3 (Lee et al., 2020). De plus, la vitexine induit l'apoptose des cellules de carcinome hépatocellulaire HepG2 en inhibant la phosphorylation d'AKT et ERK1/2 et en activant le facteur de transcription FOXO3a (Wang, et al. 2014).

La vitexine pourrait affecter diverses voies, notamment p53, l'apoptose et la voie du cycle cellulaire (arrête le cycle cellulaire en phase G2/M), dans diverses lignées cellulaires de mélanome, la vitexine pourrait également induire de manière significative l'accumulation de ROS, ce qui entraînait des dommages à l'ADN dans les lignées cellulaires de mélanome et augmentait également les niveaux de ROS dans les cellules de mélanome résistantes au BRAFi (inhibiteur de BRAF), entraînant une cytotoxicité de l'ADN, ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et ainsi l'apoptose (Liu et al., 2018).

De plus, la vitexine pourrait fonctionner comme un nouvel inhibiteur qui diminue la migration et l'invasion des lignées cellulaires de mélanome humain A375 et C8161 en ciblant la voie de signalisation STAT3 et en supprimant l'expression de MMP-2, MMP-9, vimentine, Slug et Twist (Zhang et al., 2020).

La vitexine a montré un effet antiprolifératif dans les cellules cancéreuses de l'œsophage en modifiant l'expression de p53 et Bcl2 (An et al., 2015). De plus, Wang et ses collaborateurs (2019) ont rapporté que la vitexine peut avoir un puissant impact antitumoral dans le carcinome nasopharyngé en atténuant la cascade de signalisation NF- κ B et de ses principaux régulateurs (p65, I κ B α , et IKKs). Dans une étude récente de Liu et al., (2019) la

vitexine s'est avérée réduire la prolifération et induire l'apoptose mitochondriale dans le carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) en affectant la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR.

Il a été également démontré que la vitexine réduisait la viabilité cellulaire et induisait l'apoptose dans les cellules cancéreuses orales humaines OC2 en régulant positivement p53 et ses gènes en aval p21 WAF1 et Bax (Yang et al. 2013).

La vitexine arrête la croissance des cellules cancéreuses à la phase du cycle cellulaire G2/M et ensuite induit l'apoptose. L'apoptose déclenchée par la vitexine s'accompagne généralement d'une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et des niveaux de protéine Bcl-2, ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines caspase-3 et caspase-9 (Ganesan et Xu, 2017).

De plus, les glycosides de podophyllotoxine et leurs dérivés sont considérés comme des composés phares pour le développement de médicaments anticancéreux. Le composé podophyllotoxine- β -D-glucoside présente une activité cytotoxique puissante par rapport au médicament témoin (étoposide) dans diverses lignées cellulaires cancéreuses (PC-3, HeLa, HCT-116, HEK-293, et MCF-7) (Zilla et al. 2014). Il a également été noté pour son activité cytotoxique dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses humaines, HL-60, SMMC-7721, A-549, et SW480 (Yang et al. 2019).

La podophyllotoxine et ses dérivés présentent une activité anticancéreuse, principalement en raison de sa capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline en microtubules (Kamal et al. 2014). Il est évident que les activités antioxydante et anticancéreuse observées de l'extrait pourraient être dues à l'un ou à un mélange des composés mis en évidence ci-dessus.

L'évaluation de l'activité antiproliférative et apoptotique des fractions obtenues a indiqué que l'activité inhibitrice est localisée dans deux fractions F1 et F6. Comme, il a donc fallu effectuer des analyses chimiques pour révéler les molécules responsables de cette activité.

L'activité anticancéreuse induite par F1 et F6 pourrait être due aux principaux composés détectés, à savoir vicenine-2, malvidine 3-*O*-galactoside, vitexine et l'isovitexine, genkwanine, l'oléamide, l'orientine, et lutéoline-7-*O*-glucoside.

Comme il a été rapporté auparavant vicenine-2 et vitexine possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment des effets anticancéreux.

Des effets anticancéreux sur divers modèles de cancer ont été observés après traitement avec l'isovitexine en inhibant la croissance cellulaire et induisant l'apoptose (Ganesan et Xu, 2017).

Il a également été rapporté que la malvidine-3-galactoside est caractérisée par sa fonction anti-carcinome hépatocellulaire (CHC), elle inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans les lignées CHC (HepG2 et Huh-7) (Wang et al. 2019; Lin et al. 2020).

Récemment, il a été démontré que la genkwanine exerce une activité antitumorale contre certaines cellules cancéreuses, inhibe la croissance des cellules de mélanome de souris B16F10 de manière dose-dépendante (Nasr Bouzaiene et al., 2016). Genkwanin a également montré une forte activité antiproliférative sur la lignée cellulaire HeLa (Awouafack et al. 2016) et MDA-MB-468 (Androutsopoulos et al. 2009).

De plus, l'oléamide exerce des effets antiprolifératifs sur les cellules de glioblastome RG2 par l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et l'induction de l'apoptose (Torres-Román et al. 2020).

Des études ont rapporté que l'orientine exerce un puissant effet antiprolifératif contre les cellules cancéreuses EC109 et MCF-7 (Thangaraj & Vaiyapuri, 2017) et les cellules de carcinome colorectal (HT29) en induisant l'apoptose et en bloquant le cycle cellulaire en G0/G1 (Thangaraj et al. 2019).

Lutéoline-7-*O*-glucoside inhibe la prolifération de diverses lignées cancéreuses (COLO 320 DM, AGS, MCF-7 et A549). La capacité à induire l'apoptose dans les cellules COLO 320 a été déterminée par son activité antiradicalaire en piégeant les ROS et en régulant l'expression de la β -caténine (Baskar et al. 2011).

Conclusion générale

Conclusion générale

Les profils phytochimiques qui ont été signalés pour les espèces du genre *Linum* suggèrent la présence de produits naturels qui présentent divers effets biologiques. Pour cela, les effets antioxydant et anticholinestérase et la capacité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses, à bloquer le cycle cellulaire et à induire l'apoptose par les extraits acétate d'éthyle (EAELN et EAELT) de deux espèces algériennes de *Linum*, *L. numidicum* Murb. et *L. trigynum* L et des fractions VLC (F1-F6) de l'extrait *n*-BuOH de *L. numidicum* Murb. (BELN) ont été examinés. De plus, la composition en métabolites secondaires des extraits et des fractions VLC (les plus actives) a été analysée par LC-HRMS/MS pour déterminer la relation entre leur activité et leur composition chimique.

L'étude phytochimique a indiqué que le traitement de l'extrait hydroéthanolique de chaque espèce *Linum*, par extractions liquide/liquide en utilisant des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol), a permis d'obtenir, après évaporation à sec, quatre extraits respectifs pour la plante *L. tryginum* (EEPLT, ECLT, EAELT et EBLT) et quatre extraits respectifs pour la plante *L. numidicum* (EEPLN, ECLN, EAELN et EBLN). Les extraits *n*-BuOH des deux plantes représentent le rendement le plus élevé. Le fractionnement de l'EBLN par VLC a donné 6 fractions (F1-F6). Le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux de l'EAELN et l'EAELT a révélé que l'EAELN est plus riche en ces composés par rapport à l'EAELT.

Les résultats de l'activité antioxydante (DPPH, ABTS, CUPRAC, phénanthroline, galvinoxyle) ont montré, pour la première fois, que l'EAELN et l'EAELT exercent une activité antioxydante. L'EAELN a manifesté une meilleure activité par rapport à l'EAELT, cette activité pourrait être due à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes qui ont été identifiés par LC-HRMS/MS et/ou à d'autres composés présents dans l'extrait qui peuvent agir comme agents réducteurs et piègeurs de radicaux libres. Cependant, l'EAELN et l'EAELT présentent une faible activité anticholinestérase par rapport au standard galantamine,

Nos résultats ont également montré, pour la première fois, que l'EAELN et l'EAELT, inhibent la prolifération des cellules PC3 et MDA-MB-231 de manière dose-dépendante. L'EAELN a manifesté l'activité antiproliférative la plus forte contre les deux lignées testées.

L'EAELN et l'EAELT ont induit l'apoptose des cellules PC3 ; l'effet apoptotique de l'EAELN est plus élevé que celui de l'EAELT. L'EAELN a induit un arrêt significatif du cycle cellulaire dans la phase G2/M, alors qu'un arrêt dans les phases G0/G1 et G2/M a été observé après traitement avec l'EAELT.

Dans cette étude, nous avons montré que l'EAELN et l'EAELT exercent une activité anticancéreuse en induisant l'apoptose et en bloquant le cycle cellulaire. Cela pourrait être dû à la présence de composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les lignanes et les acides phénoliques qui ont été détectés par LC-HRMS/MS. Les effets antioxydant et anticancéreux de l'EAELN sont plus élevés que ceux de l'EAELT.

De plus, les fractions VLC F1 et F6 de l'EBLN exercent une activité anticancéreuse en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose.

Les effets induits par l'EAELN, F1 et F6 pourraient être attribués à leurs principaux composés bioactifs connus pour leurs activités antioxydante et anticancéreuse tels que l'acide chicorique, vicenine-2, vitexine, isovitexine, la podophyllotoxine- β -D-glucoside, la malvidine 3-O-galactoside, genkwanine, l'oléamide, l'orientine et la lutéoline-7-glucoside.

L'EAELN, F1 et F6 peuvent être utilisés comme une excellente source de substances phytochimiques pour traiter le cancer. Les études futures devraient viser à explorer l'activité anticancéreuse de chaque composé, son mécanisme détaillé et ses effets synergiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adhikamsetty, R. K., Gollapalli, N. R., & Jonnalagadda, S. B. (2008). Complexation kinetics of Fe²⁺ with 1, 10-phenanthroline forming ferrioin in acidic solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*, 40(8), 515-523.
- Agami, R., & Bernards, R. (2000). Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell*, 102(1), 55-66.
- Alejandre-García, I., Álvarez, L., Cardoso-Taketa, A., González-Maya, L., Antúnez, M., Salas-Vidal, E., ... & Villarreal, M. L. (2015). Cytotoxic activity and chemical composition of the root extract from the Mexican species *Linum scabrellum*: Mechanism of action of the active compound 6-methoxypodophyllotoxin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A., & Qasem, I. B. (2014). In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 381-400.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Alomari, A. K., Cohen, J., Vortmeyer, A. O., Chiang, A., Gettinger, S., Goldberg, S., ... & Chiang, V. L. (2016). Possible interaction of anti-PD-1 therapy with the effects of radiosurgery on brain metastases. *Cancer immunology research*, 4(6), 481-487.
- Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine*, 3(8), 917-921.
- Amirghofran, Z., Bahmani, M., Azadmehr, A., & Javidnia, K. (2006). Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(7), 427-432.
- An, F., Wang, S., Tian, Q., & Zhu, D. (2015). Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. *Oncology letters*, 10(4), 2627-2633.
- An, F., Yang, G., Tian, J., & Wang, S. (2012). Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regeneration Research*, 7(33), 2565.

- Androutsopoulos, V. P., Ruparelia, K., Arroo, R. R., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Toxicology*, 264(3), 162-170.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International journal of food sciences and nutrition*, 57(5-6), 292-304.
- Arellano, M., & Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(4), 559-573.
- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 317S-325S.
- Asl, E. A., Mehrabadi, J. F., Afshar, D., Noorbazargan, H., Tahmasebi, H., & Rahimi, A. (2018). Apoptotic effects of *Linum album* extracts on AGS human gastric adenocarcinoma cells and ZNF703 oncogene expression. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(10), 2911.
- Aslam, M. S., Ahmad, M. S., & Mamat, A. S. (2015). Pharmacological potential of vitexin. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 2(2), 114-122.
- Astuti, P., Pike, T., Widberg, C., Payne, E., Harding, A., Hancock, J., & Gabrielli, B. (2009). MAPK pathway activation delays G2/M progression by destabilizing Cdc25B. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33781-33788.
- Averill-Bates, D., Grondin, M., & Ouellet, F. (2018). Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. *Cryobiology*, 80, 170.
- Awouafack, M. D., Aimaiti, S., Tane, P., & Morita, H. (2016). Clerodendrumol, a new triterpenoid from *Clerodendrum yaundense* Gürke (Lamiaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 99(2), 161-164.
- Ayres, D. C., Ayres, D. C., & Loike, J. D. (1990). *Lignans: chemical, biological and clinical properties*. Cambridge university press.
- Ayres, D. C., Ayres, D. C., & Loike, J. D. (1990). *Lignans: chemical, biological and clinical properties*. Cambridge university press.
- Bai, J., Li, Y., & Zhang, G. (2017). Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer biology & medicine*, 14(4), 348.
- Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S., & Phillipson, J. D. (2005). Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea*

- (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(8), 929-954.
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. In *Cell cycle control* (pp. 29-40). Humana Press, New York, NY.
- Baskar, A. A., Ignacimuthu, S., Michael, G. P., & Al Numair, K. S. (2011). Cancer chemopreventive potential of luteolin-7-O-glucoside isolated from *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Nutrition and cancer*, 63(1), 130-138.
- Bauer, R. (1991). Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. *Economic and Medical Plant Research*, 253-321.
- Belvin, M., & Mellman, I. (2015). Is all cancer therapy immunotherapy?. *Science Translational Medicine*, 7(315), 315fs48-315fs48.
- Bendris, N., Lemmers, B., & Blanchard, J. M. (2015). Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell cycle*, 14(12), 1786-1798.
- Benedict, B., van Harn, T., Dekker, M., Hermsen, S., Kucukosmanoglu, A., Pieters, W., ... & Te Riele, H. (2018). Loss of p53 suppresses replication-stress-induced DNA breakage in G1/S checkpoint deficient cells. *Elife*, 7, e37868.
- Berlin, J., Bedorf, N., Mollenschott, C., Wray, V., Sasse, F., & Höfle, G. (1988). On the podophyllotoxins of root cultures of *Linum flavum*. *Planta medica*, 54(03), 204-206.
- Bérout, C., Verdier, F., & Soussi, T. (1996). p53 gene mutation: software and database. *Nucleic acids research*, 24(1), 147-150.
- Bhardwaj, M., Cho, H. J., Paul, S., Jakhar, R., Khan, I., Lee, S. J., ... & Kang, S. C. (2018). Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 9(3), 3278.
- Bhole, R. P., Jagtap, S. R., Chadar, K. B., & Zambare, Y. B. (2020). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique-A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(1), 505-516.
- Blain, S. W., Montalvo, E., & Massagué, J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25863-25872.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., ... & Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell*, *11*(2), 529-541.
- Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1867*(6), 118688.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
- Bokros, M., & Wang, Y. (2016). Spindle assembly checkpoint silencing and beyond. *Cell Cycle*, *15*(13), 1661-1662.
- Bouchonnet, S. (2009). La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Tec & Doc. Edited by Tec & Doc Lavoisier. Tec & Doc Lavoisier Ed., France, 195 p.
- Boudermine, S., Malafronte, N., Mencherini, T., Esposito, T., Aquino, R. P., Beghidja, N., ... & Vassallo, A. (2015). Phenolic compounds from *Limonium pruinosum*. *Natural Product Communications*, *10*(2), 1934578X1501000228.
- Bouleau, S., Grimal, H., Rincheval, V., Godefroy, N., Mignotte, B., Vayssiere, J. L., & Renaud, F. (2005). FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene*, *24*(53), 7839-7849.
- Bouzaïene, N. N., Chaabane, F., Sassi, A., Chekir-Ghedira, L., & Ghedira, K. (2016). Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *Life sciences*, *144*, 80-85.
- Bower, J. J., Vance, L. D., Psioda, M., Smith-Roe, S. L., Simpson, D. A., Ibrahim, J. G., ... & Kaufmann, W. K. (2017). Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *NPJ Breast Cancer*, *3*(1), 1-12.
- Brown M.A, editor. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry Applications in Agricultural, Pharmaceutical and Environmental Chemistry*. Washington: ACS Symp. Ser; 1990. pp. 1914–1926.
- Buchkovich, K., Duffy, L. A., & Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, *58*(6), 1097-1105.
- Burak, M., & Imen, Y. (1999). Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klin Tip Bil Derg*, *19*, 296-304.

- Bury, M., Le Calvé, B., Ferbeyre, G., Blank, V., & Lessard, F. (2021). New insights into CDK regulators: novel opportunities for cancer therapy. *Trends in Cell Biology*, *31*(5), 331-344.
- Cehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., & Halazonetis, T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes & development*, *14*(3), 278-288.
- Chen, J. (2016). The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6*(3), a026104.
- Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., & Tsuruo, T. (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *264*(3), 847-854.
- Cheng, T. (2004). Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene*, *23*(43), 7256-7266.
- Chinn, I. K. (2020). XIAP Deficiency. In *Encyclopedia of Medical Immunology: Immunodeficiency Diseases* (pp. 715-718). New York, NY: Springer New York.
- Chota, A., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Interactions of multidomain pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in cancer cell death. *Oncotarget*, *12*(16), 1615.
- Chughtai, K., & Heeren, R. M. (2010). Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chemical reviews*, *110*(5), 3237–3277.
- Comino-Sanz, I. M., López-Franco, M. D., Castro, B., & Pancorbo-Hidalgo, P. L. (2021). The role of antioxidants on wound healing: A review of the current evidence. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(16), 3558.
- Courtiade, J., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2011). A comprehensive characterization of the caspase gene family in insects from the order Lepidoptera. *BMC genomics*, *12*(1), 1-12.
- Crook, N. E., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology*, *67*(4), 2168-2174.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(11), pdb-prot087288.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, *26*(8), 1001-1043.

- Cullis, C. (2011). *Linum*. In *Wild crop relatives: genomic and breeding resources* (pp. 177-189). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dalton, S. (2015). Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends in cell biology*, 25(10), 592-600.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Smolewski, P. (2001, April). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. In *Seminars in hematology* (Vol. 38, No. 2, pp. 179-193). WB Saunders.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., & Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13(8), 795-808.
- Das, M. C., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De, U. C., Tribedi, P., ... Bhattacharjee, S. (2016). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Scientific Reports*, 6, 23347.
- Dawson, P. H., French, J. B., Buckley, J. A., Douglas, D. J., & Simmons, D. (1982). The use of triple quadrupoles for sequential mass spectrometry: 1—The instrument parameters. *Organic Mass Spectrometry*, 17(5), 205-211.
- De Andrade, P., Mantoani, S. P., Nunes, P. S. G., Magadan, C. R., Perez, C., Xavier, D. J., ... & Carvalho, I. (2019). Highly potent and selective aryl-1, 2, 3-triazolyl benzylpiperidine inhibitors toward butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(6), 931-943.
- Del Bino, G., Darzynkiewicz, Z., Degraef, C., Mosselmans, R., Fokan, D., & Galand, P. (1999). Comparison of methods based on annexin-V binding, DNA content or TUNEL for evaluating cell death in HL-60 and adherent MCF-7 cells. *Cell proliferation*, 32(1), 25-37.
- Depeint, F., Gee, J. M., Williamson, G., & Johnson, I. T. (2002). Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(1), 97-103.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO journal*, 18(19), 5242-5251.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., ... & Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO journal*, 17(8), 2215-2223.

- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388(6639), 300-304.
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., ... & Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1960.
- Diogo, V., Teixeira, J., Silva, P. M., & Bousbaa, H. (2017). Spindle assembly checkpoint as a potential target in colorectal cancer: current status and future perspectives. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(1), 1-8.
- Dolan, J. W., & Snyder, L. R. (1989). Injectors and Autosamplers. In *Troubleshooting LC Systems* (pp. 235-290). Humana Press, Totowa, NJ.
- Domingues, P.; García, A.; Skrzydlewska, E. (Eds). (2018). AACLifeSci course companion manual: Advanced analytical chemistry for life sciences. 2018. ISBN 978-83-951534-7-1.
- Dong, L. Y., Li, S., Zhen, Y. L., Wang, Y. N., Shao, X., & Luo, Z. G. (2013). Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating inflammatory cytokines and MAPK pathway. *The American Journal of Chinese Medicine*, 41(06), 1251– 1266.
- Dubois, J., & Mabry, T. J. (1971). The C-glycosylflavonoids of flax, *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry*, 10(11), 2839-2840.
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., ... & Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO journal*, 15(11), 2685-2694.
- Dulić, V., Lees, E., & Reed, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, 257(5078), 1958-1961.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., ... & Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*, 14(1), 89-96.
- Dzoyem, J. P., Nkuete, A. H., Ngameni, B., & Eloff, J. N. (2017). Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from Polygonum and Dorstenia species. *Archives of pharmacal research*, 40(10), 1129-1134.

- Efferth, T., Saeed, M. E., Mirghani, E., Alim, A., Yassin, Z., Saeed, E., ... & Daak, S. (2017). Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*, 8(30), 50284.
- Eliuk, S., & Makarov, A. (2015). Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8, 61-80.
- Elkholi, R., Floros, K. V., & Chipuk, J. E. (2011). The role of BH3-only proteins in tumor cell development, signaling, and treatment. *Genes & cancer*, 2(5), 523-537.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Engel, N., Kraft, K., Müller, P., Duske, K., Kühn, J., Oppermann, C., & Nebe, B. (2015). Actin cytoskeleton reconstitution in MCF-7 breast cancer cells initiated by a native flax root extract. *Adv Med Plant Res*, 3(3), 92-105.
- Fadok, V. A., Laszlo, D. J., Noble, P. W., Weinstein, L., Riches, D. W., & Henson, P. M. (1993). Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *The Journal of Immunology*, 151(8), 4274-4285.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7), 2207-2216.
- Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., Moghannem, S., Azam, F., El-Shazly, M., & Singab, A. N. (2020). Breaking down the barriers to a natural antiviral agent: Antiviral activity and molecular docking of *Erythrina speciosa* extract, fractions, and the major compound. *Chemistry & Biodiversity*, 17, e1900511.
- Falcicchio, M., Ward, J. A., Macip, S., & Doveston, R. G. (2020). Regulation of p53 by the 14-3-3 protein interaction network: new opportunities for drug discovery in cancer. *Cell Death Discovery*, 6(1), 1-21.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842-847.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71.

- Flavone-C-glycosides from *Linum maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 27(7), Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Foijer, F., & Riele, H. T. (2006). Check, double check: the G2 barrier to cancer. *Cell Cycle*, 5(8), 831-836.
- Forcisi, S., Moritz, F., Kanawati, B., Tziotis, D., Lehmann, R., & Schmitt-Kopplin, P. (2013). Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *Journal of Chromatography A*, 1292, 51-65.
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2015). Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Frontiers in plant science*, 6, 799.
- Fulda, S. (2014). Molecular pathways: targeting inhibitor of apoptosis proteins in cancer— from molecular mechanism to therapeutic application. *Clinical Cancer Research*, 20(2), 289-295.
- Gali, L., & Bedjou, F. (2019). Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120, 163-169.
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 102-113.
- García-Gutiérrez, L., Delgado, M. D., & León, J. (2019). MYC oncogene contributions to release of cell cycle brakes. *Genes*, 10(3), 244.
- García-Laorden, M. I., Stroo, I., Blok, D. C., Florquin, S., Medema, J. P., de Vos, A. F., & van der Poll, T. (2016). Granzymes A and B regulate the local inflammatory response during *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Journal of innate immunity*, 8(3), 258-268.
- García-Reyes, J. F., Moreno-González, D., Nortes-Méndez, R., Gilbert-López, B., & Díaz, A. M. (2017). HRMS: Hardware and software. In *Applications in High Resolution Mass Spectrometry* (pp. 15-57). Elsevier.
- Gholivand, K., Hosseini, Z., Farshadian, S., & Naderi-Manesh, H. (2010). Synthesis, characterization, oxidative degradation, antibacterial activity and acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibitory effects of some new phosphorus (V) hydrazides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 5130-5139.

- Goel, S., DeCristo, M. J., McAllister, S. S., & Zhao, J. J. (2018). CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest. *Trends in cell biology*, 28(11), 911-925.
- Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9(12), 767-776.
- Gordon, E. M., Ravicz, J. R., Liu, S., Chawla, S. P., & Hall, F. L. (2018). Cell cycle checkpoint control: The cyclin G1/Mdm2/p53 axis emerges as a strategic target for broad-spectrum cancer gene therapy-A review of molecular mechanisms for oncologists. *Molecular and clinical oncology*, 9(2), 115-134.
- Gottlieb, O. R. (1972). Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, 11(5), 1537-1570.
- Greuter, W. (1991). Botanical diversity, endemism, rarity, and extinction in the Mediterranean area: an analysis based on the published volumes of Med-Checklist. *Botanika chronika*, 10, 63-79.
- Griffith, O. W., & Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (Sn-butyl homocysteine sulfoximine). *Journal of Biological Chemistry*, 254(16), 7558-7560.
- Grinstein, E., Shan, Y., Karawajew, L., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Royer, H. D., & Wernet, P. (2006). Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 22223-22235.
- Gross, J. H. (2017). Tandem mass spectrometry. In *Mass spectrometry* (pp. 539-612). Springer, Cham.
- Gulfishan, M., Afzal, M., Kazmi, I., Quazi, A. M., Bhat, T. A., & Jahan, A. (2018). Mechanism of Action of Anticancer Herbal Medicines. In *Anticancer Plants: Mechanisms and Molecular Interactions* (pp. 337-360). Springer, Singapore.
- Hammad, M. A., Omar, M. A., & Awad, M. (2017). Validation of sensitive spectrophotometric method for determination of Salmeterol xinafoate and Fenoterol hydrobromide via o-Phenanthroline and iron complexation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(06), 049-054.
- Han, X., Kuang, Y., Chen, H., Liu, T., Zhang, J., & Liu, J. (2020). p19INK4d: More than Just a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Current Drug Targets*, 21(1), 96-102.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, *75*(4), 805-816.
- Hartwell, J. L. (1982). *Plants used against cancer: a survey*. Quarterman Publications.
- Harvey, S. L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S. P., & Kellogg, D. R. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell*, *122*(3), 407-420.
- Haworth, R. D. (1936). Natural resins. *Annu. Rep. Prog. Chem*, *33*, 266-279.
- Hayen, H., Michels, A., & Franzke, J. (2009). Dielectric barrier discharge ionization for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*, *81*(24), 10239-10245.
- Haymaker, C. L., Kim, D., Uemura, M., Vence, L. M., Phillip, A., McQuail, N., ... & Diab, A. (2017). Metastatic melanoma patient had a complete response with clonal expansion after whole brain radiation and PD-1 blockade. *Cancer immunology research*, *5*(2), 100-105.
- He, M., Min, J. W., Kong, W. L., He, X. H., Li, J. X., & Peng, B. W. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, *115*, 74-85.
- Hegnauer, R. (1966). Dicotyledoneae: Daphniphyllaceae-Lythraceae. In *Chemotaxonomie der pflanzen; eine übersicht über die verbreitung und die systematische bedeutung der pflanzenstoffe*, Band 4, Burkhauser, Based, pp. 393–401.
- Hegnauer, R. (1989). Nachträge zu Band 3 und Band 4: (Acanthaceae bis Lythraceae). In *Chemotaxonomie der pflanzen; eine übersicht über die verbreitung und die Systematische bedeutung der pflanzenstoffe*. Band 8, Birkhäuser, Basel, pp. 669–672.
- Hemmati, S., Schmidt, T. J., & Fuss, E. (2007). (+)-Pinoresinol/(–)-lariciresinol reductase from *Linum perenne* Himmelszelt involved in the biosynthesis of justicidin B. *FEBS letters*, *581*(4), 603-610.
- Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019). Flavonoids: Potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In *Bioactive compounds* (pp. 265-288). Woodhead Publishing.
- Heywood, V. H., Brummitt, R. K., Culham, A., & Seberg, O. (2007). *Flowering plant families of the world* (Vol. 88). Ontario: Firefly Books.
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., & Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptoticsurvivin gene by wild type p53. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(5), 3247-3257.

- Hofmann, E., Charrette, J., Stroobant V.(1999). Spectrométrie de Masse : cours et exercices corrigés, Dunod. 2ème édition.
- Hofmann, K., Bucher, P., & Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in biochemical sciences*, 22(5), 155-156.
- Hosseini, S., Pourmousavi, S. A., Mahdavi, M., & Taslimi, P. (2022). Synthesis, and in vitro biological evaluations of novel naphthoquinone conjugated to aryl triazole acetamide derivatives as potential anti-Alzheimer agents. *Journal of Molecular Structure*, 1255, 132229.
- Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2017). Neuroprotective effects of flavonoids in epilepsy. In G. Brahmachari (Ed.), *Neuroprotective natural products: Clinical aspects and mode of action* (pp. 279– 291). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, Boschstr.
- Howard, A. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated ceils and its relation to chromosome breakage. *Heredity suppl*, 6, 261-273.
- Hudson, B. J. F. (1990). Food Antioxidants. Elseviere. *Applied Science, New York*.
- Huncharek, M., McGarry, R., & Kupelnick, B. (2001). Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer research*, 21(1B), 765-769.
- Hunt, D. F., Shabanowitz, J., & Giordani, A. B. (1980). Collision activated decompositions in mixture analysis with a triple quadrupole mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 52(3), 386-390.
- Hunt, D. F., Yates, J. R., Shabanowitz, J., Winston, S., & Hauer, C. R. (1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(17), 6233-6237.
- Huntimer, E. D., Halaweish, F. T., & Chase, C. C. (2006). Proliferative activity of Echinacea angustifolia root extracts on cancer cells: Interference with doxorubicin cytotoxicity. *Chemistry & biodiversity*, 3(6), 695-703.
- Ionkova, I. (2007). Biotechnological approaches for the production of lignans. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 57-68.
- Ionkova, I. (2008). Anticancer compounds from in vitro cultures of rare medicinal plants. *Pharmacognosy Reviews*, 2(4), 206.

- Ionkova, I., & Fuss, E. (2009). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and lignan production in *Linum tauricum* ssp. *tauricum*. *Pharmacognosy Magazine*, 5(17), 14.
- Ionkova, I., Antonova, I., Momekov, G., & Fuss, E. (2010). Production of podophyllotoxin in *Linum linearifolium* in vitro cultures. *Pharmacognosy magazine*, 6(23), 180.
- Iwasaki, T., Kondo, K., Kuroda, T., Moritani, Y., Yamagata, S., Sugiura, M., ... & Ikezawa, K. (1996). Novel selective PDE IV inhibitors as antiasthmatic agents. Synthesis and biological activities of a series of 1-aryl-2, 3-bis (hydroxymethyl) naphthalene lignans. *Journal of medicinal chemistry*, 39(14), 2696-2704.
- Jabir, N. R., Anwar, K., Firoz, C. K., Oves, M., Kamal, M. A., & Tabrez, S. (2018). An overview on the current status of cancer nanomedicines. *Current medical research and opinion*, 34(5), 911-921.
- Jain, S., Dwivedi, J., Jain, P. K., Satpathy, S., & Patra, A. (2016). Medicinal plants for treatment of cancer: A brief review. *Pharmacognosy Journal*, 8(2).
- Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205.
- Javadian, N., Karimzadeh, G., Sharifi, M., Moieni, A., & Behmanesh, M. (2017). In vitro polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae). *Planta*, 245(6), 1165-1178.
- Javidnia, K., Miri, R., Rezai, H., Jafari, A., Azarmehr, A., & Amirghofran, Z. (2005). Biological Activity and Aryltetraline Lignans of *Linum persicum*. *Pharmaceutical biology*, 43(6), 547-550.
- Jiang, P., Du, W., Heese, K., & Wu, M. (2006). The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 26(23), 9071-9082.
- Kamal, A., Reddy, T. S., Polepalli, S., Shalini, N., Reddy, V. G., Rao, A. S., ... & Shankaraiah, N. (2014). Synthesis and biological evaluation of podophyllotoxin congeners as tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(19), 5466-5475.
- Kang, N., Zhang, J. H., Qiu, F., Tashiro, S. I., Onodera, S., & Ikejima, T. (2010). Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Cancer letters*, 294(2), 147-158.

- Kasof, G. M., & Gomes, B. C. (2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3238-3246.
- Kaufmann, A. (2018). Analytical performance of the various acquisition modes in Orbitrap MS and MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(8), 725-738.
- Kaufmann, B., Souverain, S., Cherkaoui, S., Christen, P., & Veuthey, J. L. (2002). Rapid liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of withanolides in crude plant extracts by use of a monolithic column. *Chromatographia*, 56(3), 137-141.
- Khole, S., Panat, N. A., Suryawanshi, P., Chatterjee, S., Devasagayam, T. P. A., & Ghaskadbi, S. (2016). Comprehensive assessment of antioxidant activities of apigenin isomers: vitexin and isovitexin. *Free Radicals and antioxidants*, 6(2), 155-166.
- Kim, I., Chin, Y. W., Lim, S. W., Kim, Y. C., & Kim, J. (2004). Norisoprenoids and hepatoprotective flavone glycosides from the aerial parts of *Beta vulgaris* var. *cicla*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(6), 600– 603.
- Kiselevsky, D. B. (2020). Granzymes and mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, 85(2), 131-139.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., ... & Roberts, J. M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 257(5077), 1689-1694.
- Konuklugil#, B., Ionkova#, I., Vasilev, N., Schmidt, T. J., Windhövel, J., Fuss, E., & Alfermann, A. W. (2007). Lignans from *Linum* species of sections *Syllinum* and *Linum*. *Natural Product Research*, 21(1), 1-6.
- Konuklugil, B., Schmidt, T. J., & Alfermann, A. W. (1999). Accumulation of aryltetralin lactone lignans in cell suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Planta medica*, 65(06), 587-588.
- Konuklugil, B., Schmidt, T. J., & Alfermann, A. W. (2001). Accumulation of lignans in suspension cultures of *Linum mucronatum* ssp. *armenum* (Bordz.) Davis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(11-12), 1164-1165.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & Van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., ... & Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica chimica acta*, 870, 29-44.

- Ku, S. K., & Bae, J. S. (2016). Vicenin-2 and scolymoside inhibit high-glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(3), 287-295.
- Kumar, P. R., Dinesh, S. R., & Rini, R. (2016). LCMS—a review and a recent update. *J Pharm Pharm Sci*, 5, 377-391.
- Lee, B., Sandhu, S., & McArthur, G. (2015). Cell cycle control as a promising target in melanoma. *Current opinion in oncology*, 27(2), 141-150.
- Lee, H. J., Venkatarama Gowda Saralamma, V., Kim, S. M., Ha, S. E., Raha, S., Lee, W. S., ... & Kim, G. S. (2018). Pectolarigenin induced cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cell via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Nutrients*, 10(8), 1043.
- Lee, H. J., Venkatarama Gowda Saralamma, V., Kim, S. M., Ha, S. E., Raha, S., Lee, W. S., ... & Kim, G. S. (2018). Pectolarigenin induced cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cell via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Nutrients*, 10(8), 1043.
- Lee, J. H., Mohan, C. D., Shanmugam, M. K., Rangappa, S., Sethi, G., Siveen, K. S., ... & Ahn, K. S. (2020). Vitexin abrogates invasion and survival of hepatocellular carcinoma cells through targeting STAT3 signaling pathway. *Biochimie*, 175, 58-68.,
- Lee, L. S., Choi, E. J., Kim, C. H., Sung, J. M., Kim, Y. B., Seo, D. H., ... & Park, J. D. (2016). Contribution of flavonoids to the antioxidant properties of common and tartary buckwheat. *Journal of Cereal Science*, 68, 181-186.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., & Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & development*, 9(6), 639-649.
- Lee, M. S., & Kerns, E. H. (1999). LC/MS applications in drug development. *Mass spectrometry reviews*, 18(3-4), 187-279.
- Lee, S. K., Nam, K. A., & Heo, Y. H. (2003). Cytotoxic activity and G2/M cell cycle arrest mediated by antofine, a phenanthroindolizidine alkaloid isolated from *Cynanchum paniculatum*. *Planta medica*, 69(01), 21-25.
- Lee, S. K., Nam, K. A., & Heo, Y. H. (2003). Cytotoxic activity and G2/M cell cycle arrest mediated by antofine, a phenanthroindolizidine alkaloid isolated from *Cynanchum paniculatum*. *Planta medica*, 69(01), 21-25.

- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., & George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. *Nature cell biology*, 6(5), 443-450.
- Levine, A. J. (2019). The many faces of p53: something for everyone. *Journal of molecular cell biology*, 11(7), 524-530.
- Li, L. K., Rola, A. S., Kaid, F. A., Ali, A. M., & Alabsi, A. M. (2016). Goniotalamin induces cell cycle arrest and apoptosis in H400 human oral squamous cell carcinoma: A caspase-dependent mitochondrial-mediated pathway with downregulation of NF- κ B. *Archives of oral biology*, 64, 28-38.
- Li, Y. Z., Lu, D. Y., Tan, W. Q., Wang, J. X., & Li, P. F. (2008). p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein ARC. *Molecular and cellular biology*, 28(2), 564-574.
- Li, Y., Barbash, O., & Diehl, J. A. (2015). Regulation of the cell cycle. In *The molecular basis of cancer* (pp. 165-178). WB Saunders.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- Lin, J., Tian, J., Shu, C., Cheng, Z., Liu, Y., Wang, W., ... & Wang, Y. (2020). Malvidin-3-galactoside from blueberry suppresses the growth and metastasis potential of hepatocellular carcinoma cell Huh-7 by regulating apoptosis and metastases pathways. *Food Science and Human Wellness*, 9(2), 136-145.
- Listen, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., ... & Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379(6563), 349-353.
- Liu, N., Wang, K. S., Qi, M., Zhou, Y. J., Zeng, G. Y., Tao, J., ... & Peng, C. (2018). Vitexin compound 1, a novel extraction from a Chinese herb, suppresses melanoma cell growth through DNA damage by increasing ROS levels. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-16.
- Liu, W., Vetreno, R. P., & Crews, F. T. (2021). Hippocampal TNF-death receptors, caspase cell death cascades, and IL-8 in alcohol use disorder. *Molecular psychiatry*, 26(6), 2254-2262.
- Liu, X., Jiang, Q., Liu, H., & Luo, S. (2019). Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biological research*, 52(1), 1-7.

- Logarinho, E., & Bousbaa, H. (2008). Kinetochore-microtubule interactions “in check” by Bub1, Bub3 and BubR1: The dual task of attaching and signalling. *Cell cycle*, 7(12), 1763-1768.
- López, G. B., Romero, M. C., Cabezudo, B., Torres, C. M., & Salazar, C. (Eds.). (2011). *Claves de la flora vascular de Andalucía oriental* (Vol. 49). Universidad Almería.
- Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21:485-495.
- Mace, P. D., Linke, K., Feltham, R., Schumacher, F. R., Smith, C. A., Vaux, D. L., ... & Day, C. L. (2008). Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31633-31640.
- Maecker, H. L., Koumenis, C., & Giaccia, A. J. (2000). p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer research*, 60(16), 4638-4644.
- Maier, J. K., Lahoua, Z., Gendron, N. H., Fetni, R., Johnston, A., Davoodi, J., ... & MacKenzie, A. E. (2002). The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *Journal of Neuroscience*, 22(6), 2035-2043.
- Maller, J. L. (1990). MPF and cell cycle control. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, 24, 323-328.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., & Sharma, P. K. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of global pharma technology*, 2(5), 22-26.
- Mantena, S. K., Sharma, S. D., & Katiyar, S. K. (2006). Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 5(2), 296-308.
- Masui, Y., & Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 177(2), 129-145.
- Matheson, C. J., Backos, D. S., & Reigan, P. (2016). Targeting WEE1 kinase in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 37(10), 872-881.
- McDILL, J. R., & Simpson, B. B. (2011). Molecular phylogenetics of Linaceae with complete generic sampling and data from two plastid genes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(1), 64-83.
- McDill, J., Replinger, M., Simpson, B. B., & Kadereit, J. W. (2009). The phylogeny of *Linum* and Linaceae subfamily Linoideae, with implications for their systematics, biogeography, and evolution of heterostyly. *Systematic Botany*, 34(2), 386-405.
- McLafferty, F. W. (1981). Tandem mass spectrometry. *Science*, 214(4518), 280-287.

- Medema, R. H., Klompaker, R., Smits, V. A., & Rijksen, G. (1998). p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene*, *16*(4), 431-441.
- Medhe, S. (2018). Mass spectrometry: detectors review. *Chem Biomol Eng*, *3*(4), 51-58.
- Medjahdi, B., Letreuch-Belarouci, A., Maazouz, S., & Taïbi, K. (2018). Diversité floristique des subéraies des monts de Tlemcen (Nord Ouest Algérien). *Fl. Medit*, *28*, 67-77.
- Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *ONCOLOGIE-PARIS*, *5*(7/8), 311-326.
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., & Horning, S. (2011). Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, *10*(9), M111.011015.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell*, *11*(3), 577-590.
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., ... & Liu, S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, *21*(17), 2613-2622.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., ... & Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, *9*(6), 1799-1805.
- MOHAGHEGHZADEH, A., Hemmati, S., & Alfermann, A. W. (2006). Quantification of aryltetralin lignans in *Linum album* organs and in vitro cultures.
- Mohagheghzadeh, A., Hemmati, S., Mehregan, I., & Alfermann, A. W. (2003). *Linum persicum*: Lignans and placement in Linaceae. *Phytochemistry Reviews*, *2*(3), 363-369.
- Mohagheghzadeh, A., Schmidt, T. J., & Alfermann, A. W. (2002). Arylnaphthalene lignans from in vitro cultures of *Linum austriacum*. *Journal of natural products*, *65*(1), 69-71.
- Mohamed, M. S., Bishr, M. K., Almutairi, F. M., & Ali, A. G. (2017). Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, *22*(12), 1487-1509.
- Mohammed, M. M. D., Chen, M., Zhai, L., & Ibrahim, N. A. (2010). The cytotoxic activity of *Linum grandiflorum* leaves. *European Journal of Chemistry*, *1*(2), 110-114.

- Mohammed, M. M., Christensen, L. P., Ibrahim, N. A., Awad, N. E., Zeid, I. F., & Pedersen, E. B. (2009). New acylated flavone and cyanogenic glycosides from *Linum grandiflorum*. *Natural Product Research*, 23(5), 489-497.
- Mohammed, M. M., Christensen, L. P., Ibrahim, N. A., Awad, N. E., Zeid, I. F., Pedersen, E. B., ... & Colla, P. L. (2009). Anti-HIV-1 activities of the extracts from the medicinal plant *Linum grandiflorum* Desf.: In Proceedings of 4th Conference on Research and Development of Pharmaceutical Industries (Current Challenges). *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(Special Issue 1), 37-41
- Mombach, J., Bugs, C. A., & Chaouiya, C. (2014). Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint. *BMC genomics*, 15(7), 1-11.
- Morris, J. R., Hartl, D. L., Knoll, A. H., Lue, R., Michael, M., Berry, A., ... & Holbrook, N. M. (2013). *Biology: How life works* (p. 1200). New York City: WH Freeman.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Muir, A. D., & Westcott, N. D. (Eds.). (2003). *Flax: the genus Linum*. CRC press.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- Muller, M. (1998). Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, and Krammer PH. p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, 188, 2033-2045.
- MURBECK, S.V. (1905): Contributions à la connaissance de la flore du NordOuest de l'Afrique et plus spécialement de la Tunisie. Deuxième série: 70.- Impr. Hakan Ohlsson, Lund.
- Musacchio, A. (2015). The molecular biology of spindle assembly checkpoint signaling dynamics. *Current biology*, 25(20), R1002-R1018
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(5), 379-393.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *cell*, 88(3), 355-365.
- Naito, R., Nishinakamura, H., Watanabe, T., Nakayama, J., & Kodama, S. (2014). Edaravone, a free radical scavenger, accelerates wound healing in diabetic mice. *Wounds*, 26(6), 163-171.

- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell*, 7(3), 683-694.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., ... & Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Developmental cell*, 6(5), 661-672.
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *Elife*, 3, e02872.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022-1037.
- Niculescu III, A. B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., & Reed, S. I. (1998). Effects of p21Cip1/Waf1 at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and cellular biology*, 18(1), 629-643.
- Nilsson, I., & Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Progress in cell cycle research*, 107-114.
- Noda, M., Fukui, K., & Uchiyama, S. (2016). Mass spectrometry. In *Advanced Methods in Structural Biology* (pp. 185-198). Springer, Tokyo.
- Nordberg, A., Ballard, C., Bullock, R., Darreh-Shori, T., & Somogyi, M. (2013). A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *The primary care companion for CNS disorders*, 15(2), 26731.
- Novák, B., Sible, J. C., & Tyson, J. J. (2001). Checkpoints in the cell cycle. *e LS*.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., & Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*, 36(1), 617-656.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., & Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*, 36(1), 617-656.
- O'Reilly, E., Tirincsi, A., Logue, S. E., & Szegezdi, E. (2016). The Janus face of death receptor signaling during tumor immunoediting. *Frontiers in immunology*, 7, 446.

- Ockendon, D. J., & Walters, S. M. (1968). *Linum L. Flora Europaea*, 2, 206-211.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., ... & Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053-1058.
- Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H., & LeRoith, D. (1998). p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology*, 139(3), 1101-1107.
- Ojima, I. (2008). Modern natural products chemistry and drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 51(9), 2587-2588.
- Oostdam, A., Mol, J. N., & van der Plas, L. H. (1993). Establishment of hairy root cultures of *Linum flavum* producing the lignan 5-methoxypodophyllotoxin. *Plant Cell Reports*, 12(7), 474-477.
- Osińska, I., Popko, K., & Demkow, U. (2014). Perforin: an important player in immune response. *Central-European journal of immunology*, 39(1), 109.
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115.
- Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.
- Paier, C. R. K., Maranhão, S. S. A., Carneiro, T. R., Lima, L. M., Rocha, D. D., Santos, R. D. S., ... & Pessoa, C. (2018). Natural products as new antimitotic compounds for anticancer drug development. *Clinics*, 73.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Parasuraman, S., Anish, R., Balamurugan, S., Muralidharan, S., Kumar, K.J., & Vijayan, V. (2014). An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharmaceutical methods*, 5, 47.
- Parry, D., Bates, S., Mann, D. J., & Peters, G. (1995). Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *The EMBO journal*, 14(3), 503-511.
- Pearson, A. S., Spitz, F. R., Swisher, S. G., Kataoka, M., Sarkiss, M. G., Meyn, R. E., ... & Roth, J. A. (2000). Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after

- adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 6(3), 887-890.
- Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M., & Soragni, F. (2004). Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of Echinacea spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(2), 289-301.
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Pietrzak, M., & Puzianowska-Kuznicka, M. (2008). p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Prakash, C., Shaffer, C. L., & Nedderman, A. (2007). Analytical strategies for identifying drug metabolites. *Mass spectrometry reviews*, 26(3), 340-369.
- Proceedings of the II Pharmaceutical Congress "Neu Perspectives in Controlled
- Quézel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS) Paris. *Tome II*, 1032.
- Quílez, A., Berenguer, B., Gilardoni, G., Souccar, C., de Mendonça, S., Oliveira, L. F., ... Vidari, G. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 583– 589.
- Rafieian-Kopaei, M., Shakiba, A., Sedighi, M., & Bahmani, M. (2017). The analgesic and anti-inflammatory activity of *Linum usitatissimum* in Balb/c mice. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(4), 892-896.

- Raj, S. P., Solomon, P. R., & Thangaraj, B. (2022). Linaceae. In *Biodiesel from Flowering Plants* (pp. 371-377). Springer, Singapore.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reddy, S. K., Rape, M., Margansky, W. A., & Kirschner, M. W. (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature*, 446(7138), 921-925.
- Reynisdottir, I., & Massague, J. (1997). The subcellular locations of p15 (Ink4b) and p27 (Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes & development*, 11(4), 492-503.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., & Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes & development*, 9(15), 1831-1845.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod.
- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1994). [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. In *Methods in enzymology* (Vol. 234, pp. 279-293). Academic Press.
- Robles, A. I., Bemmels, N. A., Foraker, A. B., & Harris, C. C. (2001). APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer research*, 61(18), 6660-6664.
- Rochat, B. (2018). Quantitative and qualitative LC-high-resolution MS: The technological and biological reasons for a shift of paradigm. *Recent advances in analytical chemistry*.
- Rogers, C. M. (1981). A revision of the genus *Linum* in southern Africa. *Nordic Journal of Botany*, 1(6), 711-722.
- Rogers, C. M. (1982). The systematics of *Linum* sect. *Linopsis* (Linaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 140(2), 225-234.
- Rogers, C. M. (1982). The systematics of *Linum* sect. *Linopsis* (Linaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 140(2), 225-234.

- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., & Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83(7), 1243-1252.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO journal*, 16(23), 6914-6925.
- Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutter, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., ... & MacKenzie, A. (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 80(1), 167-178.
- Saibaba, S. V., Kumar, M. S., & Pandiyan, P. S. (2016). Mini review on LC/MS techniques. *World J Pharm Pharm Sci*, 5, 2381-2395.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., & Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, 277(5331), 1497-1501.
- Sánchez-Aguilera, A., Delgado, J., Camacho, F. I., Sánchez-Beato, M., Sánchez, L., Montalbán, C., ... & García, J. F. (2004). Silencing of the p18INK4c gene by promoter hypermethylation in Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Blood*, 103(6), 2351-2357.
- Sasheva, P., Letkarska, G., & Ionkova, I. (2013). Biotechnological production of podophyllotoxin and podophyllotoxin-related lignans in cultures of *Linum thracicum* Degen. *Comptes Rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 66(10), 1445-1450.
- Sax, J. K., Fei, P., Murphy, M. E., Bernhard, E., Korsmeyer, S. J., & El-Deiry, W. S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nature cell biology*, 4(11), 842-849.
- Schmidt, T. J., Vöβing, S., Klaes, M., & Grimme, S. (2007). An aryldihydronaphthalene lignan with a novel type of ring system and further new lignans from *Linum perenne* L. *Planta medica*, 73(15), 1574-1580.
- Schulze-Bergkamen, H., & Krammer, P. H. (2004, February). Apoptosis in cancer—implications for therapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 31, No. 1, pp. 90-119). WB Saunders.
- Schwartz, G. K., & Shah, M. A. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of clinical oncology*, 23(36), 9408-9421.

- Scott, R. P. W. (1992). Modern liquid chromatography. *Chemical Society Reviews*, 21(2), 137-145.
- Seyfried, T. N., & Shelton, L. M. (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism*, 7(1), 1-22.
- Sgambato, A., Cittadini, A., Faraglia, B., & Weinstein, I. B. (2000). Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells: a review. *Journal of cellular physiology*, 183(1), 18-27.
- Shah, Z., Patel, H., More, J., Dalwadi, M., Shah, C., & Upadhayay, U. (2021). A review on lcms technique and it's application.
- Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., & Nagpal, A. K. (2018). Polyphenols in food: Cancer prevention and apoptosis induction. *Current Medicinal Chemistry*, 25(36), 4740-4757.
- Sharma, M., Pandey, C., Sharma, N., Kamal, M. A., Sayeed, U., & Akhtar, S. (2018). Cancer nanotechnology-an excursion on drug delivery systems. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(15), 2078-2092.
- Sheeja Malar, D., Beema Shafreen, R., Karutha Pandian, S., & Pandima Devi, K. (2017). Cholinesterase inhibitory, anti-amyloidogenic and neuroprotective effect of the medicinal plant *Grewia tiliaefolia* – An in vitro and in silico study. *Pharmaceutical Biology*, 55, 381– 393.
- Sherr, C. J. (1998). Tumor surveillance via the ARF–p53 pathway. *Genes & development*, 12(19), 2984-2991.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 13(12), 1501-1512.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 13(12), 1501-1512.
- Shi, H., Noguchi, N., & Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. In *Methods in enzymology* (Vol. 335, pp. 157-166). Academic Press.
- Shibata, M. A., Hasegawa, R., Kurata, Y., Yamada, M., Tamano, S., & Fukushima, S. (1990). Bladder epithelial hyperplasia in F344 rats after intravesical instillation of the antitumor chemotherapeutic agents Adriamycin® and mitomycin C. *Cancer letters*, 49(1), 41-49.

- Shibata, M. A., Hasegawa, R., Kurata, Y., Yamada, M., Tamano, S., & Fukushima, S. (1990). Bladder epithelial hyperplasia in F344 rats after intravesical instillation of the antitumor chemotherapeutic agents Adriamycin® and mitomycin C. *Cancer letters*, 49(1), 41-49.
- Siddiqui, A. J., Jahan, S., Singh, R., Saxena, J., Ashraf, S. A., Khan, A., ... & Adnan, M. (2022). Plants in anticancer drug discovery: from molecular mechanism to chemoprevention. *BioMed Research International*, 2022.
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20-31.
- Silke, J., & Meier, P. (2013). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins—modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a008730.
- Silva, P. M., Reis, R. M., Bolanos-Garcia, V. M., Florindo, C., Tavares, Á. A., & Bousbaa, H. (2014). Dynein-dependent transport of spindle assembly checkpoint proteins off kinetochores toward spindle poles. *FEBS letters*, 588(17), 3265-3273.
- Silva, P., Barbosa, J., Nascimento, A. V., Faria, J., Reis, R., & Bousbaa, H. (2011). Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell proliferation*, 44(5), 391-400.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Smits, V. A., & Gillespie, D. A. (2015). DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *The FEBS journal*, 282(19), 3681-3692.
- Smollny, T., Wichers, H., De Rijk, T., Van Zwam, A., Shasavari, A., & Alfermann, A. W. (1992). Formation of Lignans in Suspension Cultures of *Linum album*. *Planta Medica*, 58(S 1), 622-624.
- Smollny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shasavari, A., Petersen, M., & Alfermann, A. W. (1998). Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry*, 48(6), 975-979.
- Spoerri, L., Oo, Z. Y., Larsen, J. E., Haass, N. K., Gabrielli, B., & Pavey, S. (2015). Cell cycle checkpoint and DNA damage response defects as anticancer targets: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. In *Stress Response Pathways in Cancer* (pp. 29-49). Springer, Dordrecht.

- Stosic, D., Gorunovic, M., Skaltsounis, A. L., Tillequin, F., & Koch, M. (1989). Flavonoids of the leaves from *Linum-capitatum* kit. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*, 39(3), 215-218.
- Sudakin, V., Chan, G. K., & Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*, 154(5), 925-936.
- Suhaili, S. H., Karimian, H., Stellato, M., Lee, T. H., & Aguilar, M. I. (2017). Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. *Biophysical reviews*, 9(4), 443-457.
- Sukari, A., Nagasaka, M., Al-Hadidi, A., & Lum, L. G. (2016). Cancer immunology and immunotherapy. *Anticancer research*, 36(11), 5593-5606.
- Sun, J. L., Deng, A. J., Li, Y., Li, Z. H., Chen, H., & Qin, H. L. (2009). First Example of Diterpenoids from 14, 15-Cyclopimarane in the Roots of *Linum usitatissimum*. *Helvetica Chimica Acta*, 92(12), 2746-2753.
- Sveinsson, S., McDill, J., Wong, G. K., Li, J., Li, X., Deyholos, M. K., & Cronk, Q. C. (2014). Phylogenetic pinpointing of a paleopolyploidy event within the flax genus (*Linum*) using transcriptomics. *Annals of Botany*, 113(5), 753-761.
- Swaffer, M. P., Jones, A. W., Flynn, H. R., Snijders, A. P., & Nurse, P. (2016). CDK substrate phosphorylation and ordering the cell cycle. *Cell*, 167(7), 1750-1761.
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
- Tait, J. F., Gibson, D., & Fujikawa, K. (1989). Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 7944-7949.
- Takebayashi, J., Tai, A., Gohda, E., & Yamamoto, I. (2006). Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-O-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 766-771.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2(8), 151-153.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., & Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74(5), 845-853.

- Teles, R. H. G., Moralles, H. F., & Cominetti, M. R. (2018). Global trends in nanomedicine research on triple negative breast cancer: a bibliometric analysis. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 2321.
- Teodor, E. D., Moroeanu, V., & Radu, G. L. (2020). Lignans from medicinal plants and their anticancer effect. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *20*(12), 1083-1090.
- Thangaraj, K., & Vaiyapuri, M. (2017). Orientin, a C-glycosyl dietary flavone, suppresses colonic cell proliferation and mitigates NF- κ B mediated inflammatory response in 1, 2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *96*, 1253-1266.
- Thangaraj, K., Balasubramanian, B., Park, S., Natesan, K., Liu, W., & Manju, V. (2019). Orientin induces G0/G1 cell cycle arrest and mitochondria mediated intrinsic apoptosis in human colorectal carcinoma HT29 cells. *Biomolecules*, *9*(9), 418.
- Theil, C., Briese, V., Richter, D. U., Jeschke, U., & Friese, K. (2013). An ethanolic extract of *Linum usitatissimum* caused cell lethality and inhibition of cell vitality/-proliferation of MCF-7 and BT20 mamma carcinoma cells in vitro. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *288*(1), 149-153.
- Tinel, A., & Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, *304*(5672), 843-846.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemaierova, A., Dehner, A., Klein, C., ... & Moll, U. M. (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(13), 8600-8606.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, *103*(3), 816-822.
- Torres-Román, A. L., García-Hernández, V. M., Rangel-López, E., Ruiz-García, E., Meneses-García, A., Santamaría, A., ... & Ortega-Gómez, A. (2020). Oleamide Induces Cell Death in Glioblastoma RG2 Cells by a Cannabinoid Receptor-Independent Mechanism. *Neurotoxicity Research*, *38*(4), 941-956.
- Tsai, C. M., Yen, G. C., Sun, F. M., Yang, S. F., & Weng, C. J. (2013). Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells. *Molecular Pharmaceutics*, *10*(5), 1890-1900.
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, *2*(3), 371-390.

- Van Hooren, A. M. N., & Nooteboom, H. P. (1984). Linaceae. *Flora Malesiana-Series 1, Spermatophyta*, 10(1), 607-619.
- van Jaarsveld, M. T., Deng, D., Wiemer, E. A., & Zi, Z. (2019). Tissue-specific Chk1 activation determines apoptosis by regulating the balance of p53 and p21. *Iscience*, 12, 27-40.
- Vasilev, N. P., & Ionkova, I. (2005). Cytotoxic activity of extracts from *Linum* cell cultures. *Fitoterapia*, 76(1), 50-53.
- Vasilev, N., & Ionkova, I. (2005). Lignan Production by Cell Cultures of *Linum setaceum*. and *Linum campanulatum*. *Pharmaceutical biology*, 43(6), 509-511.
- Vasilev, N., Ebel, R., Edrada, R. A., Fuss, E., Alfermann, A. W., Ionkova, I., ... & Schmidt, T. J. (2008). Metabolic profiling of lignan variability in *Linum* species of section *Syllinum* native to Bulgaria. *Planta medica*, 74(03), 273-280.
- Vasilev, N., Ebel, R., Edrada, R. A., Fuss, E., Alfermann, A. W., Ionkova, I., ... & Schmidt, T. J. (2008). Metabolic profiling of lignan variability in *Linum* species of section *Syllinum* native to Bulgaria. *Planta medica*, 74(03), 273-280.
- Vasilev, N., Momekov, G., Zaharieva, M., Konstantinov, S., Bremner, P., Heinrich, M., & Ionkova, I. (2005). Cytotoxic activity of a podophyllotoxin-like lignan from *Linum tauricum* Willd. *Neoplasma*, 52(5), 425-429.
- Vasilev, N., Nedialkov, P., Ionkova, I., & Ninov, S. (2004). HPTLC densitometric determination of justicidin B in *Linum* in vitro cultures. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(7), 528-529.
- Vatan, O., Yılmaz, O., Huriyet, H., Cavas, T., & Cinkılıç, N. (2017). Antiproliferative Effect of Methanolic Extract of *Linum arboreum* on A549 Cells. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 1(10), 1028.
- Venkataramani, R. N., MacLachlan, T. K., Chai, X., El-Deiry, W. S., & Marmorstein, R. (2002). Structure-based Design of p18INK4cProteins with Increased Thermodynamic Stability and Cell Cycle Inhibitory Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48827-48833.
- Venkataramani, R. N., MacLachlan, T. K., Chai, X., El-Deiry, W. S., & Marmorstein, R. (2002). Structure-based Design of p18INK4cProteins with Increased Thermodynamic

- Vera, J., Raatz, Y., Wolkenhauer, O., Kottek, T., Bhattacharya, A., Simon, J. C., & Kunz, M. (2015). Chk1 and Wee1 control genotoxic-stress induced G2–M arrest in melanoma cells. *Cellular signalling*, 27(5), 951-960.
- Vermes, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), 167-190.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
- Vermijlen, D., Luo, D., Froelich, C. J., Medema, J. P., Kummer, J. A., Willems, E., ... & Wisse, E. (2002). Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *Journal of leukocyte biology*, 72(4), 668-676.
- Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L., & Reiffers, J. (2001). Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiothérapie*, 5(2), 109-129.
- Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current biology*, 27(14), R713-R715.
- Vigneswara, V., & Ahmed, Z. (2020). The role of caspase-2 in regulating cell fate. *Cells*, 9(5), 1259.
- Visconti, R., Della Monica, R., & Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-8.
- Volk, O. H., & Sinn, M. (1968). Linosid ein neues Flavon aus *Linum maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 23(7), 1017-1017.
- Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Current biology*, 10(21), 1359-1366.
- Wagner, H., Budweg, W., Iyengar, M. A., Volk, O., & Sinn, M. (1972). Linosid A und B, 809-812.
- Walker, N. P. C., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenza, C. R., ... & Wong, W. W. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme: a (p20/p10) 2 homodimer. *Cell*, 78(2), 343-352.

- Wang, J. G., Zheng, X. X., Zeng, G. Y., Zhou, Y. J., & Yuan, H. (2014). Purified vitexin compound 1 induces apoptosis through activation of FOXO3a in hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*, 31(1), 488-496.
- Wang, R., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Ashorn, C. L., Gallick, G. E., Stukenberg, P. T., ... & Kuang, J. (2007). Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell*, 128(6), 1119-1132.
- Wang, W., Cheng, H., Gu, X., & Yin, X. (2019). The natural flavonoid glycoside vitexin displays preclinical antitumor activity by suppressing NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 12, 4461.
- Wei, Y., Fan, T., & Yu, M. (2008). Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(4), 278-288.
- Weinmann, W., Gergov, M., & Goerner, M. (2000). MS/MS-libraries with triple quadrupole-tandem mass spectrometers for drug identification and drug screening. *Analisis*, 28(10), 934-941.
- Weiss, S. G., Tin-Wa, M., Perdue Jr, R. E., & Farnsworth, N. R. (1975). Potential anticancer agents II: antitumor and cytotoxic lignans from *Linum album* (Linaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(1), 95-98.
- Wichers, H. J., Harkes, M. P., & Arroo, R. R. (1990). Occurrence of 5-methoxypodophyllotoxin in plants, cell cultures and regenerated plants of *Linum flavum*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 23(2), 93-100.
- Wichers, H. J., Versluis-De Haan, G. G., Marsman, J. W., & Harkes, M. P. (1991). Podophyllotoxin related lignans in plants and cell cultures of *Linum flavum*. *Phytochemistry*, 30(11), 3601-3604.
- Willett, W. C. (2006). The Mediterranean diet: science and practice. *Public health nutrition*, 9(1a), 105-110.
- Winkler, H. (1931). Linaceae, Trib. I. 3. Linoideae-Eulineae. *Die Nature-Li-chen Pflanzenfamilien Nebst Ihren Gattungen Und Wichtigeren Arten, Insbesondere Den Nutzpflanzen*. W. Engelmann, Leipzig, 111-120.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald 3rd, E. R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., ... & El-Deiry, W. S. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics*, 17(2), 141-143.
- Wu, Y. L., Mehew, J. W., Heckman, C. A., Arcinas, M., & Boxer, L. M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene*, 20(2), 240-251.

- Xiang, P., He, R. W., Han, Y. H., Sun, H. J., Cui, X. Y., & Ma, L. Q. (2016). Mechanisms of housedust-induced toxicity in primary human corneal epithelial cells: Oxidative stress, proinflammatory response and mitochondrial dysfunction. *Environment international*, 89, 30-37.
- Yan, G., Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features. *World Academy of Sciences Journal*, 2(2), 39-48.
- Yan, M., Tang, C., Ma, Z., Huang, S., & Dong, Z. (2016). DNA damage response in nephrotoxic and ischemic kidney injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 313, 104-108.
- Yang, J. K. (2015). Death effector domain for the assembly of death-inducing signaling complex. *Apoptosis*, 20(2), 235-239.
- Yang, J., Pemberton, A., Morrison, W. I., & Connelley, T. (2018). Granzyme B is an essential mediator in CD8+ T cell killing of *Theileria parva*-infected cells. *Infection and immunity*, 87(1), e00386-18.
- Yang, L., Yang, Z. M., Zhang, N., Tian, Z., Liu, S. B., & Zhao, M. G. (2014). Neuroprotective effects of vitexin by inhibition of NMDA receptors in primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 386(1-2), 251–258.
- Yang, S. H., Liao, P. H., Pan, Y. F., Chen, S. L., Chou, S. S., & Chou, M. Y. (2013). The novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells. *Phytotherapy Research*, 27(8), 1154-1161.
- Yang, V. W. (2018). The cell cycle. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 197-219.
- Yau, A., Lee, J., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for Protein Delivery in Anticancer Applications. *Pharmaceutics* 2021, 13, 155.
- Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Eva, Y. H. L., & Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & development*, 16(5), 571-582.
- Yener, I., Kocakaya, S. O., Ertas, A., Erhan, B., Kaplaner, E., Oral, E. V., ... & Kolak, U. (2020). Selective in vitro and in silico enzymes inhibitory activities of phenolic acids and flavonoids of food plants: Relations with oxidative stress. *Food Chemistry*, 327, 127045.
- Yost, R. A., & Enke, C. G. (1978). Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *Journal of the American Chemical Society*, 100(7), 2274-2275.

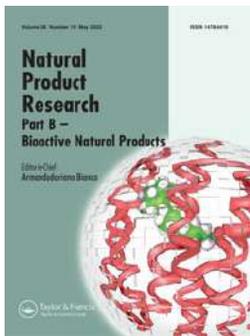
- Yost, R. A., & Enke, C. G. (1979). Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Analytical chemistry*, 51(12), 1251-1264.
- Yost, R. A., Enke, C. G., McGilvery, D. C., Smith, D., & Morrison, J. D. (1979). High efficiency collision-induced dissociation in an rf-only quadrupole. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 30(2), 127-136.
- Yu, H. (2006). Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint: the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model. *The Journal of cell biology*, 173(2), 153-157.
- Zálešák, F., Bon, D. J. Y. D., & Pospíšil, J. (2019). Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research*, 146, 104284.
- Zare, K., Movafeghi, A., Mohammadi, S. A., Asnaashari, S., & Nazemiyeh, H. (2014). New Phenolics from *Linum mucronatum* subsp. orientale. *BioImpacts : BI*, 4(3), 117–122.
- Zhang, G., Li, D., Chen, H., Zhang, J., & Jin, X. (2018). Vitexin induces G2/M-phase arrest and apoptosis via Akt/mTOR signaling pathway in human glioblastoma cells. *Molecular medicine reports*, 17(3), 4599-4604.
- Zhang, J., Chen, J., Liang, Z., & Zhao, C. (2014). New lignans and their biological activities. *Chemistry & Biodiversity*, 11(1), 1-54.
- Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K. L., Pang, X., & Luo, X. (2016). Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell death & disease*, 7(6), e2266-e2266.
- Zhang, W., Zhou, L., & Liu, G. (2020). Vitexin inhibited the invasion, metastasis, and progression of human melanoma cells by targeting STAT3 signaling pathway. *bioRxiv*.
- Zhao, Y., Dai, C., Wang, Z., Chen, W., Liu, J., Zhuo, R., ... & Huang, S. (2019). A novel curcumin-loaded composite dressing facilitates wound healing due to its natural antioxidant effect. *Drug design, development and therapy*, 13, 3269.
- Zhou, S., & Huang, G. (2022). The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112556.
- Zhou, Y., Liu, Y. E., Cao, J., Zeng, G., Shen, C., Li, Y., ... & Shi, Y. E. (2009). Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clinical Cancer Research*, 15(16), 5161-5169.
- Zhu, Q., Mao, L. N., Liu, C. P., Sun, Y. H., Jiang, B., Zhang, W., & Li, J. X. (2016). Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.

- Zi, C. T., Yang, L., Kong, Q. H., Li, H. M., Yang, X. Z., Ding, Z. T., ... & Zhou, J. (2019). Glucoside derivatives of podophyllotoxin: Synthesis, physicochemical properties, and cytotoxicity. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 3683.
- Zilla, M. K., Nayak, D., Amin, H., Nalli, Y., Rah, B., Chakraborty, S., ... & Ali, A. (2014). 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside isolated from *Podophyllum hexandrum* exhibits potential anticancer activities by altering Chk-2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 100-107.
- Zimdahl Kahlin, A., Helander, S., Wennerstrand, P., Vikingsson, S., Mårtensson, L. G., & Appell, M. L. (2021). Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 128(1), 52-65.
- zwei neue Flavon-C-glykoside aus *Linum maritimum* L./Linoside A and B, Two New

Références web

- [R1] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000021903;jsessionid=9E364D6B6455F6E6986E0EEB7CD8CA04>
- [R2] http://www.marz-kreations.com/WildPlants/LINA/Linum_trigynum.php
- [R3] <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2353414>
- [R4] <https://gdebelair.com/tax/zzeo.html#Linaceae>

Publications scientifiques



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Evaluation of antiproliferative activity, apoptotic induction and LC-HRMS/MS analyses of the VLC fractions of *L. numidicum*

Ryma Mouna, Alexis Broisat, Marlène Debiossat, Ahcène Boumendjel, Catherine Ghezzi & Zahia Kabouche

To cite this article: Ryma Mouna, Alexis Broisat, Marlène Debiossat, Ahcène Boumendjel, Catherine Ghezzi & Zahia Kabouche (2022): Evaluation of antiproliferative activity, apoptotic induction and LC-HRMS/MS analyses of the VLC fractions of *L. numidicum*, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2022.2084738](https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2084738)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2084738>

 View supplementary material 

 Published online: 06 Jun 2022.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



Evaluation of antiproliferative activity, apoptotic induction and LC-HRMS/MS analyses of the VLC fractions of *L. numidicum*

Ryma Mouna^{a,b}, Alexis Broisat^b, Marlène Debiossat^b, Ahcène Boumendjel^b, Catherine Ghezzi^b and Zahia Kabouche^a

^aUniversité des frères Mentouri-Constantine 1, Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Constantine, Algeria; ^bUniversité de Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, LRB, Grenoble, France

ABSTRACT

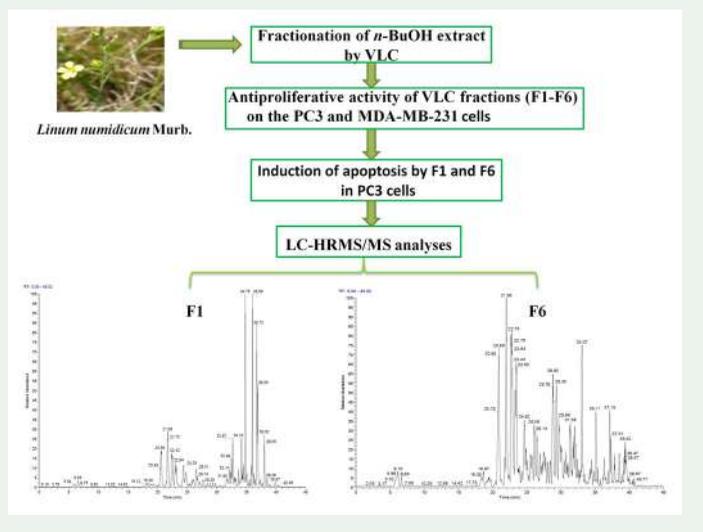
In this study, six vacuum liquid chromatography (VLC) fractions (F1–F6) of the *n*-BuOH extract of *L. numidicum* Murb. (BELN) were examined for their anticancer capacity. The composition of secondary metabolites was analyzed by LC-HRMS/MS. The antiproliferative effect against PC3 and MDA-MB-231 lines was evaluated by MTT assay. Apoptosis of PC3 cells was detected by annexin V-FITC/PI staining using a flow cytometer. The results showed that only fractions 1 and 6 inhibited PC3 and MDA-MB-231 cell proliferation in a dose-dependent manner and induced dose-dependent apoptosis of PC3 cells, evidenced by the accumulation of early and late apoptotic cells, and by the decrease in viable cells. LC-HRMS/MS profiling of fractions 1 and 6 revealed the presence of known compounds that may be responsible for the observed anticancer activity. F1 and F6 may be an excellent source of active phytochemicals for cancer treatment.

ARTICLE HISTORY

Received 5 April 2022
Accepted 25 May 2022

KEYWORDS

Antiproliferative activity; Apoptosis; LC-HRMS/MS; *L. numidicum* Murb.; VLC



1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO) 2020, Cancer is the main cause of death in the world with nearly 10 million deaths, the highest incidences in the world are observed for breast and prostate cancers.

Linum genus (Linaceae) includes more than 200 species distributed worldwide (Rogers 1982). Several studies have reported that *Linum* species could inhibit the growth of various types of cancer cell lines through cell cycle arrest and induction of apoptosis (Asl et al. 2018; Alejandre-García et al. 2015).

The aim of this study was to investigate the ability of vacuum liquid chromatography (VLC) fractions (F1–F6) of the *n*-BuOH extract of the endemic species *L. numidicum* Murb. (BELN) to inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis. In addition, the secondary metabolites composition of the most active fractions (F1 and F6) was analyzed by LC-HRMS/MS to determine the relationship between their anticancer activity and their chemical composition.

2. Results and discussion

2.1. Antiproliferative activity of VLC fractions of BELN (F1–F6) on the PC3 and MDA-MB-231 cells

Fractionation of BELN by VLC yielded 6 fractions F1 (MeOH/H₂O, 2:8, v/v), F2 (3/7), F3 (4/6), F4 (6/4), F5 (8/2), and F6 (10/0). Evaluation of the antiproliferative activity of the fractions obtained indicated that the antiproliferative activity was localized in two fractions F1 (2/8) and F6 (10/0) (Figure S1 and S2). Fractions 1 and 6 inhibited PC3 and MDA-MB 231 cell proliferation in a dose-dependent manner with IC₅₀ of $182.07 \pm 4.40 \mu\text{g/mL}$ and $175.85 \pm 3.75 \mu\text{g/mL}$, respectively, for F1 and $158.6 \pm 0.82 \mu\text{g/mL}$ and $117.13 \pm 5.37 \mu\text{g/mL}$, respectively, for F6 (Table S1). This could be explained by the presence of polyphenols such as flavonoids, phenolic acids in both extracts (Table S2). Polyphenols could exert anticancer effects through different mechanisms, including inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis (Abbas et al. 2017). Therefore, the current study suggests that polyphenols, detected in the extracts, might exhibit anticancer activity.

2.2. Induction of apoptosis by F1 and F6 in PC3 cells

To explore the mechanism by which F1 and F6 inhibit cell proliferation, a flow cytometer analysis of apoptosis using annexin V-FITC/PI double staining was performed. F1 and F6 induced dose-dependent apoptosis of PC3 cells, evidenced by the accumulation of early and late apoptotic cells, and the decrease in viable cells, with a greater effect at 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$ (**** $p < 0.0001$) compared with the negative control (Figure S3(a,b) and S4 (a,b)).

The proportion of total apoptotic cells (early and late) after F1 treatment increased from $14.2 \pm 0.77\%$ (control) to $18.3 \pm 1.1\%$ (65.5 $\mu\text{g/mL}$), $47.5 \pm 0.8\%$ (125 $\mu\text{g/mL}$), and $92.4 \pm 1.8\%$ (250 $\mu\text{g/mL}$), respectively, and after treatment with F6, the proportion of

total apoptotic cells increased from $14.2 \pm 0.77\%$ (control) to $24.2 \pm 1.32\%$ ($65.5 \mu\text{g/mL}$), $68.9 \pm 1.34\%$ ($125 \mu\text{g/mL}$), and $97.2 \pm 0.4\%$ ($250 \mu\text{g/mL}$), respectively.

The apoptotic effect induced by F1 and F6 can be attributed to its main bioactive compounds and other compounds present in the extract through a direct and also synergistic effect (Table S2).

2.3. LC-HRMS/MS analyses of F1 and F6

The evaluation of the antiproliferative and apoptotic activity of the fractions obtained indicated that the inhibitory activity was localized in two fractions F1 and F6. It was therefore necessary to perform chemical analyses to reveal the molecules responsible for this activity. Therefore, LC-HRMS/MS analyses were necessary to study the structure-activity relationship. LC-HRMS/MS analyses of F1 and F6 revealed the presence of 72 and 58 compounds, respectively (Table S2 and Figure S5(a,b)). Flavonoids (32 compounds were detected in F1 and F6) and phenolic acids (15 compounds in F1 and 8 in F6) are the most important classes.

Thirty two flavonoids (flavones, flavonols, isoflavones, neoflavonoids, chalcones, and an anthocyanidin) were detected in F1. The major compounds were vicenin-2 isomer 3 (15), vicenin-2 isomer 4 (19), vicenin-2 isomer 2 (10), isovitexin (32), orientin isomer 1 (23), homoorientin (25), and vitexin (33) with respective percentages of 8.4, 8.01, 6.91, 5.58, 3.72, 3.48, and 3.03% (Table S2). 3 lignans, lanicepside B (13), olivil 4'-O-glucoside (14) and podophyllotoxin- β -D-glucoside (62) were detected. In addition, 15 phenolic acids were detected with feruloyltyramine (6) as the major compounds (22.58%). The analyses also showed the presence of a coumarin derivatives (46), besides other compounds including a carbohydrate, melibiose (1), 2 alkaloids (3 and 24), a polyketide (43), 9 terpenoids (50, 53, 59, 60, 66, 67, 68,69, and 70), and 8 fatty acids were detected palmitamide (75) and oleamide (76) were the major compounds with percentages of 9.18 and 5.62%, respectively.

Thirty two flavonoids (flavones, flavonols, isoflavones, neoflavonoids, chalcone, and anthocyanidin) were detected in F6 with vicenin-2 isomer 4 (19), malvidin 3-O-galactoside (44), isovitexin (32), genkwanin (54), vicenin-2 isomer 2 (10), orientin isomer 2 (27), orientin isomer 1 (23) and luteolin-7-O- β -D-glucoside (48) as major compounds with respective percentages of 15.29, 12.36, 8.66, 6.63, 6, 5.45, 4.71, and 3.62%, respectively. The same two lignans (13 and 14) as those detected in F1 were also found in F6, 8 phenolic acids were detected feruloyltyramine (6) was also detected as the major compound (22.9%) in F6. The same other compounds (46, 3, 24, 43, 53, 59, 66, 67, 68, 69, 2, 71, 72, 75, and 76) belonging to different phytochemical classes, which were detected in F1, were also characterized in F6.

The anticancer activity induced by F1 and F6 could be due to the major compounds detected, namely vicenin-2, malvidin 3-O-galactoside, vitexin and isovitexin, genkwanin, oleamide, orientin, and luteolin-7-O-glucoside. Indeed, vicenin-2 has been reported to possess numerous pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer effects (Yang et al. 2018). Studies conducted by Nagaprashantha et al. (2011) showed that vicenin-2 induces antiangiogenic, pro-apoptotic, and antiproliferative activity in prostate cancer cells. It has also been reported

that malvidin-3-galactoside inhibits proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines HepG2 and Huh-7 (Wang et al. 2019; Lin et al. 2020). Vitexin and isovitexin are flavones, anticancer effects on various cancer models were also observed for these two compounds, inhibit cell growth and induce apoptosis (Ganesan and Xu 2017). Genkwanin also showed strong antiproliferative activity on HeLa cell line (Awouafack et al. 2016) and MDA-MB-468 (Androutsopoulos et al. 2009). In addition, oleamide exerts antiproliferative effects on RG2 glioblastoma cells through cell cycle arrest in the S phase and induction of apoptosis (Torres-Román et al. 2020). Studies have reported that orientin exerts a potent antiproliferative effect against EC109 and MCF-7 cancer cells (Thangaraj and Vaiyapuri 2017) and colorectal carcinoma cells (HT29) by inducing apoptosis and blocking the cell cycle in G0/G1 (Thangaraj et al. 2019). Luteolin- 7-O-glucoside inhibits the proliferation of various COLO 320 DM, AGS, MCF-7, and A549 lines. The ability to induce apoptosis in in COLO 320 cells was determined by its antiradical activity by scavenging ROS and regulating β -catenin expression (Baskar et al. 2011).

3. Experimental

The experimental section is available online in the [supplementary material](#).

4. Conclusion

Our results demonstrated for the first time that the VLC fractions F1 and F6 of the *n*-BuOH extract of *L. numidicum* (BELN) exert anticancer activity by inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. This could be attributed to its major bioactive compounds such as vicenin-2, malvidin 3-O-galactoside, vitexin and isovitexin, genkwanin, oleamide, orientin, and luteolin-7-glucoside. F1 and F6 can be used as an excellent source of phytochemicals to treat cancer. Future studies should aim to explore the anticancer activity of each compound, its detailed mechanism, and its synergistic effects.

Acknowledgments

The authors thank M. Pezet and the IAB photonic imaging and flow cytometry facility (Microcell), member of the Life Science Imaging-in vitro and labelled by the French National Research Infrastructure IBISA.

Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

The authors gratefully acknowledge DGRSDT-MESRS, Algeria and Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (LRB), France for financial support.

References

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. 2017. Natural polyphenols: an overview. *Int J Food Prop.* 20(8):1689–1699.
- Asl EA, Fallah Mehrabadi J, Afshar D, Noorbazargan H, Tahmasebi H, Rahimi A. 2018. Apoptotic effects of *Linum album* extracts on AGS human gastric adenocarcinoma cells and ZNF703 oncogene expression. *Asian Pac J Cancer Prev.* 19(10):2911–2916.
- Alejandro-García I, Álvarez L, Cardoso-Taketa A, González-Maya L, Antúnez M, Salas-Vidal E, Díaz JF, Marquina-Bahena S, Villarreal ML. 2015. Cytotoxic activity and chemical composition of the root extract from the Mexican species *Linum scabrellum*: mechanism of action of the active compound 6-Methoxypodophyllotoxin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:298463.
- Androutsopoulos VP, Ruparelia K, Arroo RR, Tsatsakis AM, Spandidos DA. 2009. CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Toxicology.* 264(3):162–170.
- Awouafack MD, Aimaiti S, Tane P, Morita H. 2016. Clerodendrumol, a new triterpenoid from *Clerodendrum yaundense* GÜRKE (Lamiaceae). *HCA.* 99(2):161–164.
- Baskar AA, Ignacimuthu S, Michael GP, Al Numair KS. 2011. Cancer chemopreventive potential of luteolin-7-O-glucoside isolated from *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Nutr Cancer.* 63(1):130–138.
- Ganesan K, Xu B. 2017. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. *Ann N Y Acad Sci.* 1401(1):102–113.
- Lin J, Tian J, Shu C, Cheng Z, Liu Y, Wang W, Liu R, Li B, Wang Y. 2020. Malvidin-3-galactoside from blueberry suppresses growth and metastasis potential of hepatocellular carcinoma cell Huh-7 by regulating apoptosis and metastases pathways. *Food Sci Hum Wellness.* 9(2): 136–145.
- Nagaprashantha LD, Vatsyayan R, Singhal J, Fast S, Roby R, Awasthi S, Singhal SS. 2011. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochem Pharmacol.* 82(9):1100–1109.
- Rogers CM. 1982. The systematics of *Linum* sect. *Linopsis* (Linaceae). *Pl Syst Evol.* 140(2–3): 225–234.
- Thangaraj K, Balasubramanian B, Park S, Natesan K, Liu W, Manju V. 2019. Orientin induces G0/G1 cell cycle arrest and mitochondria mediated intrinsic apoptosis in human colorectal carcinoma HT29 cells. *Biomolecules.* 9(9):418.
- Thangaraj K, Vaiyapuri M. 2017. Orientin, a C-glycosyl dietary flavone, suppresses colonic cell proliferation and mitigates NF- κ B mediated inflammatory response in 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis. *Biomed Pharmacother.* 96:1253–1266.
- Torres-Román AL, García-Hernández VM, Rangel-López E, Ruiz-García E, Meneses-García A, Santamaría A, Aschner M, Prospero-García O, Ortega-Gómez A. 2020. Oleamide induces cell death in glioblastoma RG2 cells by a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Neurotox Res.* 38(4):941–956.
- Wang Y, Lin J, Tian J, Si X, Jiao X, Zhang W, Gong E, Li B. 2019. Blueberry malvidin-3-galactoside suppresses hepatocellular carcinoma by regulating apoptosis, proliferation, and metastasis pathways in vivo and in vitro. *J Agric Food Chem.* 67(2):625–636.
- Yang D, Zhang X, Zhang W, Rengarajan T. 2018. Vicenin-2 inhibits Wnt/ β -catenin signaling and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line. *Drug Des Devel Ther.* 12:1303–1310.



Antiproliferative activity, cell-cycle arrest, apoptotic induction and LC-HRMS/MS analyses of extracts from two *Linum* species

Ryma Mouna, Alexis Broisat, Abdalwahab Ahmed, Marlène Debiossat, Ahcène Boumendjel, Catherine Ghezzi & Zahia Kabouche

To cite this article: Ryma Mouna, Alexis Broisat, Abdalwahab Ahmed, Marlène Debiossat, Ahcène Boumendjel, Catherine Ghezzi & Zahia Kabouche (2022) Antiproliferative activity, cell-cycle arrest, apoptotic induction and LC-HRMS/MS analyses of extracts from two *Linum* species, *Pharmaceutical Biology*, 60:1, 1491-1501, DOI: [10.1080/13880209.2022.2102196](https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2102196)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2102196>



© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 09 Aug 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE



Antiproliferative activity, cell-cycle arrest, apoptotic induction and LC-HRMS/MS analyses of extracts from two *Linum* species

Ryma Mouna^{a,b}, Alexis Broisat^b, Abdalwahab Ahmed^c, Marlène Debiossat^b, Ahcène Boumendjel^b, Catherine Ghezzi^b and Zahia Kabouche^a

^aUniversité des frères Mentouri-Constantine 1, Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Constantine, Algeria; ^bUniversité de Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, LRB, Grenoble, France; ^cDepartment of Chemistry, College of Science, Sudan University of Science and Technology, Khartoum, Sudan

ABSTRACT

Context: *Linum* is the largest genus of the Linaceae family; the species of this genus are known to have anticancer activity.

Objective: In this study, ethyl acetate extracts of *L. numidicum* Murb. (EAELN) and *L. trigynum* L. (EAELT) were examined, for the first time, for their anticancer capacity. The secondary metabolites compositions were analysed by LC-HRMS/MS.

Materials and methods: The antiproliferative effect of EAELN and EAELT (0–10.000 µg/mL) against PC3 and MDA-MB-231 cell lines were evaluated by the MTT assay after 72 h of treatment. Flow cytometer analysis of apoptosis (Annexin V-FITC/PI) and cell cycle (PI/RNase) was also performed after treatment with EAELN and EAELT at 250, 500, and 1000 µg/mL, for 24 h.

Results: EAELN had the highest antiproliferative activity against PC3 (IC₅₀ 133.2 ± 5.73 µg/mL) and MDA-MB-231 (IC₅₀ 156.9 ± 2.83 µg/mL) lines, EAELN had also shown better apoptotic activity with 19 ± 2.47% (250 µg/mL), 87.5 ± 0.21% (500 µg/mL), and 92 ± 0.07% (1000 µg/mL), respectively, causing cell cycle arrest of PC3 cells in G2/M phase, whereas arrest in G0/G1 and G2/M phases was observed after treatment with EAELT. LC-HRMS/MS profiling of the extracts revealed the presence of known compounds that might be responsible for the observed anticancer activity such as chicoric acid, vicenin-2, vitexin and podophyllo-toxin-β-D-glucoside.

Discussion and conclusions: We have shown, for the first time, that EAELN and EAELT exert anticancer activity through cell cycle arrest and induction of apoptosis. EAELN can be considered as a source to treat cancer. Further studies will be required to evaluate the effect of the active compounds, once identified, on other cancer cell lines.

ARTICLE HISTORY

Received 25 January 2022

Revised 23 May 2022

Accepted 11 July 2022

KEYWORDS

L. numidicum Murb.; *Linum trigynum* L.; anticancer activity; phytochemical profiling

Introduction

Cancer is the second main cause of death in the world and remains one of the most difficult diseases to combat (Teles et al. 2018). Cancer is characterised by the uncontrolled proliferation of cells, loss of cell cycle control and insensitivity to apoptosis which often lead to the formation of malignant tumours, which can invade neighbouring parts of the organism (Seyfried and Shelton 2010).

The development of anticancer drugs and more effective treatment strategies to improve the quality of life of patients is of great importance in the field of oncology. Currently, cancer treatments, such as chemotherapy and radiotherapy have drawbacks, including strong systemic toxicities and local irritations (Shibata et al. 1990; Huncharek et al. 2001). In addition, resistance to anticancer drugs and adverse outcomes of radiotherapy (Jabir et al. 2018; Lee et al. 2018) emphasise the urgent need to discover new, less toxic agents with higher clinical efficacy (Lee et al. 2003; Newman and Cragg 2007).

Medicinal plants are known for constituting a rich source of clinically relevant anticancer compounds. In this context, the

inhibition of cancer cell proliferation and induction of apoptosis by phytochemicals is considered a promising feature of chemotherapeutic drugs (Lowe and Lin 2000; Gurumurthy et al. 2001). Currently, many major anticancer drugs available are either natural products or their derivatives, such as taxol, vinblastine, vincristine, and camptothecin (Newman et al. 2003; Newman and Cragg 2007; Ojima 2008).

The *Linum* genus (Linaceae) includes more than 200 species distributed throughout the world (Rogers 1982). Several studies have reported that *Linum* species might inhibit the growth of various types of cancer cell lines through cell cycle arrest and induction of apoptosis (Amirghofran et al. 2006; Mohammed et al. 2010; Alejandre-García et al. 2015; Akbari Asl et al. 2018). The investigation of the phytochemical composition of *Linum* species revealed the presence of lignan-type compounds (Vasilev et al. 2008). These types of compounds constitute an important group of natural products that exert different biological activities and can serve as lead compounds for the development of new therapeutic agents with antiangiogenic, antirheumatic, antipsoriasis, antiasthmatic, hypolipidemic, antifungal, and antiviral activity (Ayres and Loike 1990; Iwasaki et al. 1996). Moreover, cytotoxic

CONTACT Zahia Kabouche  zahiakabouche@umc.edu.dz  Université des frères Mentouri-Constantine 1, Constantine, Algeria

© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and antitumor activities are of major interest for these types of lignans (Ayres and Loike 1990).

The present study determines the ability of the ethyl acetate extracts (EAELN and EAELT) of two Algerian *Linum* species, *L. numidicum* Murb. and *L. trigynum* L., respectively, to inhibit cancer cell proliferation, block the cell cycle and induce apoptosis. In addition, the secondary metabolites composition of the two extracts was analysed by LC-HRMS/MS to determine the relationship between their anticancer activity and their chemical composition.

According to the World Health Organisation (WHO) 2020, the highest incidences in the world are observed for breast and prostate cancers. We, therefore, decided, as proof of concept, to test the effect of our extracts on breast and prostate cancer cell lines.

Materials and methods

Preparation of ethyl acetate extracts of *L. numidicum* and *L. trigynum*

L. numidicum was collected in June 2018 from Djebel Babor in Sétif (North-Eastern Algeria), while the collection of *L. trigynum* was made in June 2017 from the region of Djebel El-Ouahch in Constantine (North-Eastern Algeria). The two plants used in the study were authenticated by Prof. Gérard de Bélair (ENSA, El-Harrach, Algeria). They are registered in the herbarium of the Laboratory LOST at University Mentouri Constantine 1 with the respective Voucher codes LOST.LN.06.18 and LOST.LT.06.17.

They are also registered at the national herbarium GdB: <https://gdebelair.com/tax/zzeo.html#Linaceae>

Id: 077_44, Taxon: Linaceae, *Linum numidicus* Murbeck, Coordinates: $x = 5.455072$, $y = 36.493397$, $z = 1855$ m, Locality: Djebel Babor (Sétif)

Id: 011_42, Taxon: Linaceae, *Linum trigynum* L., Coordinates: $x = 6.66415$, $y = 36.403014$, $z = 970$ m, Locality: Djebel El Ouahch (Constantine)

The aerial parts of *L. numidicum* and *L. trigynum* (900 g), previously dried and pulverised, were individually macerated at room temperature in a hydroalcoholic mixture (EtOH/H₂O, 8:2, v/v) for a period of 72 h. The crude extracts obtained were taken up with distilled water (1000 mL). The latter underwent liquid/liquid type extractions, using solvents of increasing polarity (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol). The obtained organic phases were concentrated under reduced pressure to dryness.

Sample preparation

Dried acetate extracts from both plants (EAELN and EAELT) were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO, Sigma Aldrich) followed by an RPMI medium. The DMSO content in the solution did not exceed 0.1%. The mixture was then centrifuged to remove insoluble ingredients and the supernatant was passed through sterilisation filters. The solution was diluted with an RPMI medium and prepared at different concentrations.

Cell culture

MDA-MB-231 cells, derived from pleural effusion of breast adenocarcinoma, from ATCC, were cultured in DMEM (PAN Biotech; Aidenbach, Germany) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Dominique Dutscher, SA; Brumath, France)

and 1% penicillin/streptomycin. The PC3 prostate cancer line from ATCC was cultured using RPMI 1640 medium (PAN Biotech; Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The cell lines were grown in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ and 95% humidity.

MTT test

The antiproliferative activity of EAELN and EAELT against the two selected cell lines was evaluated by the MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich), according to Mossman (1983). PC3 and MDA-MB-231 lines (5000 cells/well) were seeded in 96-well plates and incubated with different concentrations of EAELN and EAELT (2.44, 9.77, 39.06, 156.25, 625, 2500, and 10.000 µg/mL). Cells without treatment were used as controls. After 72 h of exposure to the extracts, the wells were emptied, washed with PBS and then 100 µL of MTT (5 mg/mL) was added to each well. The plates were then incubated for an additional 2 h at 37 °C and 5% CO₂. After that, the medium was carefully aspirated and the formed formazan crystals were dissolved in DMSO. The absorbance in each well was measured at 570 nm using a microplate reader (Varioskan LUX, Thermo Scientific).

Apoptosis assay

Cell apoptosis induced by EAELN and EAELT was detected by Annexin V-FITC/PI staining according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen TM FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I). PC3 cells (10⁵ cells/well) were treated with EAELN and EAELT after seeding in 96-well plates with different concentrations (250, 500, and 1000 µg/mL) for 24 h. Cells were then washed with PBS buffer, centrifuged, and stained with 5 µL of Annexin V and 5 µL of propidium iodide (PI). After 15 min of incubation at room temperature, 400 µL of binding buffer was added. Stained cells were determined using Accuri TM-C6 flow cytometry (BD-Biosciences).

Cell cycle analysis

The cell cycle was determined using a cell cycle detection kit (BD Pharmingen TM PI/RNase Staining Buffer). PC3 cells (10⁶ cells/well) were treated with EAELN and EAELT after seeding in 6-well plates with different concentrations (250, 500, and 1000 µg/mL) for 24 h. At the end of the treatment, cells were collected and washed with cold PBS and fixed in cold 70% ethanol (−20 °C) for 2 h. The cells were then centrifuged and the cell pellet was resuspended with 0.5 mL of a mixture containing propidium iodide and RNase. After 15 min of incubation at room temperature, the DNA content of the cells was quantified using an Accuri TM-C6 flow cytometer (BD-Biosciences).

LC-HRMS/MS analyses

LC – ESI – DDA – HRMS/MS spectra were obtained using a Dionex Ultimate 3000 liquid chromatography (HPLC) system equipped with an Ultimate 3000 RS pump hyphenated to a Thermo Instruments MS system (LTQ Orbitrap XL). The HPLC analysis was performed on a Water BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm) and using the following solvents: Solvent A 0.1% formic acid H₂O, Solvent B 0.1% formic acid acetonitrile. The gradient used was 5% B for 5 min, 5–100% for 20 min, and

100% for 7 min. The flow rate used was 0.150 mL/min and the column temperature was at 45 °C. MS/MS spectra were realised using MZmine 2.53 with a mass detection noise level set at 2E4 and 2E, respectively in both positive and negative ion modes. The compound identification was aided by using the Global Natural Product Social Molecular Networking platform (GNPS).

Statistical analyses

Data analyses were performed using GraphPad PRISM software (version 8.0.2). All experiments were performed in triplicate. One-way or 2-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* comparisons was used as indicated in the legends. Data are presented as mean \pm SD. Significant differences were set at a *p*-value < 0.05.

Results

Antiproliferative effect of EAELN and EAELT on the PC3 and MDA-MB-231 cell lines

To study the effect of EAELN and EAELT on the growth of human prostate and breast cancer cells, PC3 and MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of extracts for 72 h, and cell viability was determined using the MTT assay.

MTT assay results indicated that EAELN and EAELT inhibited the proliferation of PC3 and MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner (Figures 1 and 2), with semi-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 133.2 \pm 5.73 μ g/mL and 156.9 \pm 2.83 μ g/mL, respectively, for EAELN and 415.8 \pm 2.33 μ g/mL and 307.5 \pm 2.97 μ g/mL, respectively, for EAELT (Table 1).

Induction of apoptosis by EAELN and EAELT in PC3 cells

To explore the mechanism by which EAELN and EAELT inhibit cell proliferation, a flow cytometer apoptosis analysis, using Annexin V-FITC/PI double staining, was performed after a 24 h exposure period to different extract concentrations (250, 500, and 1000 μ g/mL).

EAELN and EAELT induced apoptosis of PC3 cells, which was evidenced by the accumulation of early and late apoptotic cells, and by the decrease of viable cells, with a higher effect at a

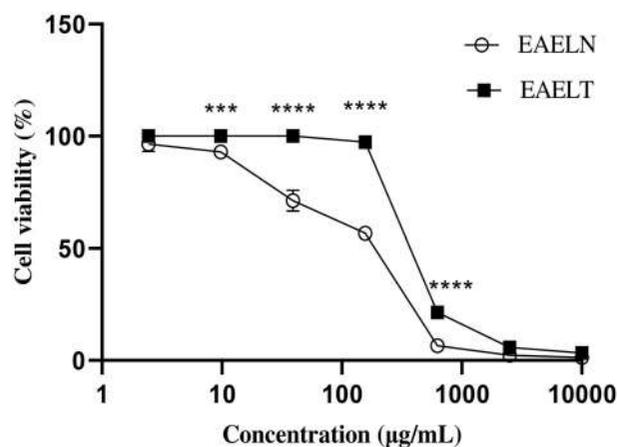


Figure 1. Dose-dependent effect of EAELN and EAELT on the viability of PC3 cancer cells. Cell viability was determined by an MTT assay and was expressed as a percentage. Cells were treated with tow extracts at different concentrations for 72 h. Data are expressed as mean \pm SD (*n* = 3), ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, EAELN versus EAELT. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's correction.

dose of 500 and 1000 μ g/mL (*****p* < 0.0001) compared with the negative control (Figures 3A,B and 4A,B).

The proportion of total apoptotic cells (early and late) after treatment with EAELN increased from 8.3 \pm 2.26% (control) to 19 \pm 2.47% (250 μ g/mL), 87.5 \pm 0.21% (500 μ g/mL), and 92 \pm 0.07% (1000 μ g/mL), respectively, and after treatment with EAELT, the proportion of total apoptotic cells increased from 8.2 \pm 2.33% (control) to 19.1 \pm 0.35% (250 μ g/mL), 50.4 \pm 1.77% (500 μ g/mL), and 74.4 \pm 1.27% (1000 μ g/mL), respectively.

Induction of cell cycle arrest in PC3 cells by EAELN and EAELT

To better understand the mechanism by which EAELN and EAELT inhibit cell proliferation, flow cytometry analysis using PI staining was performed to assess cell cycle distribution in the PC3 cell line after 24 h of exposure to 250, 500, and 1000 μ g/mL of extract. After treatment with EAELN, the percentage of cells in the G0/G1 and S phase was reduced, while that in the G2/M phase was significantly increased (*****p* < 0.0001).

The percentage of cells in the G0/G1 phase in the three groups of samples treated with EAELN was 75.60 \pm 0.47%, 73.75 \pm 0.22%, and 71.79 \pm 0.01 (****p* < 0.001) for 250, 500, and 1000 μ g/mL, respectively, while that of the control was 74.46 \pm 0.49%. The percentage of cells in S phase increased from 19.29 \pm 1.39% (control) to 5.66 \pm 0.53% (250 μ g/mL), 7.96 \pm 0.20% (500 μ g/mL), and 10.55 \pm 0.55 (1000 μ g/mL), all *****p* < 0.0001 compared with control, while that in G2/M phase went from

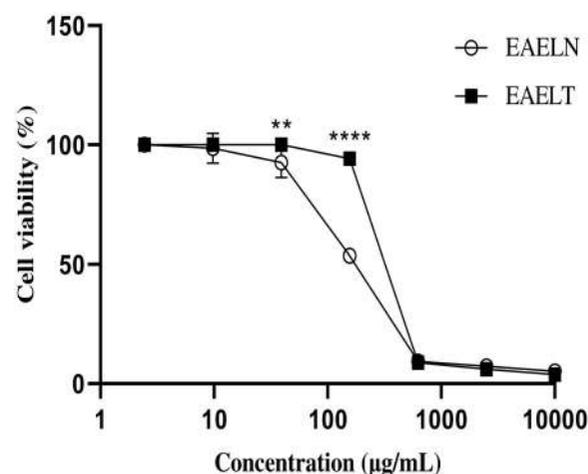


Figure 2. Dose-dependent effects of EAELN and EAELT on the viability of MDA-MB-231 cancer cells. Cell viability was determined by an MTT assay and was expressed as a percentage. Cells were treated with tow extracts at different concentrations for 72 h. Data are expressed as mean \pm SD (*n* = 3), ***p* < 0.01, *****p* < 0.0001, EAELN versus EAELT, Two-way ANOVA followed by Bonferroni's correction.

Table 1. IC₅₀ values (μ g/mL) of ethyl acetate extracts of *L. numidicum* (EAELN) and *L. trigynum* (EAELT) against the prostate cancer line (PC3) and the breast adenocarcinoma line (MDA-MB-231).

Cell type	IC ₅₀ values (μ g/mL)	
	EAELN	EAELT
PC3	133.2 \pm 5.73	415.8 \pm 2.33
MDA-MB-231	156.9 \pm 2.83	307.5 \pm 2.97

Data are presented as mean \pm SD of IC₅₀ (μ g/mL) from three independent experiments. EAELN, Ethyl acetate extract of *L. numidicum*; EAELT, Ethyl acetate extract of *L. trigynum*.

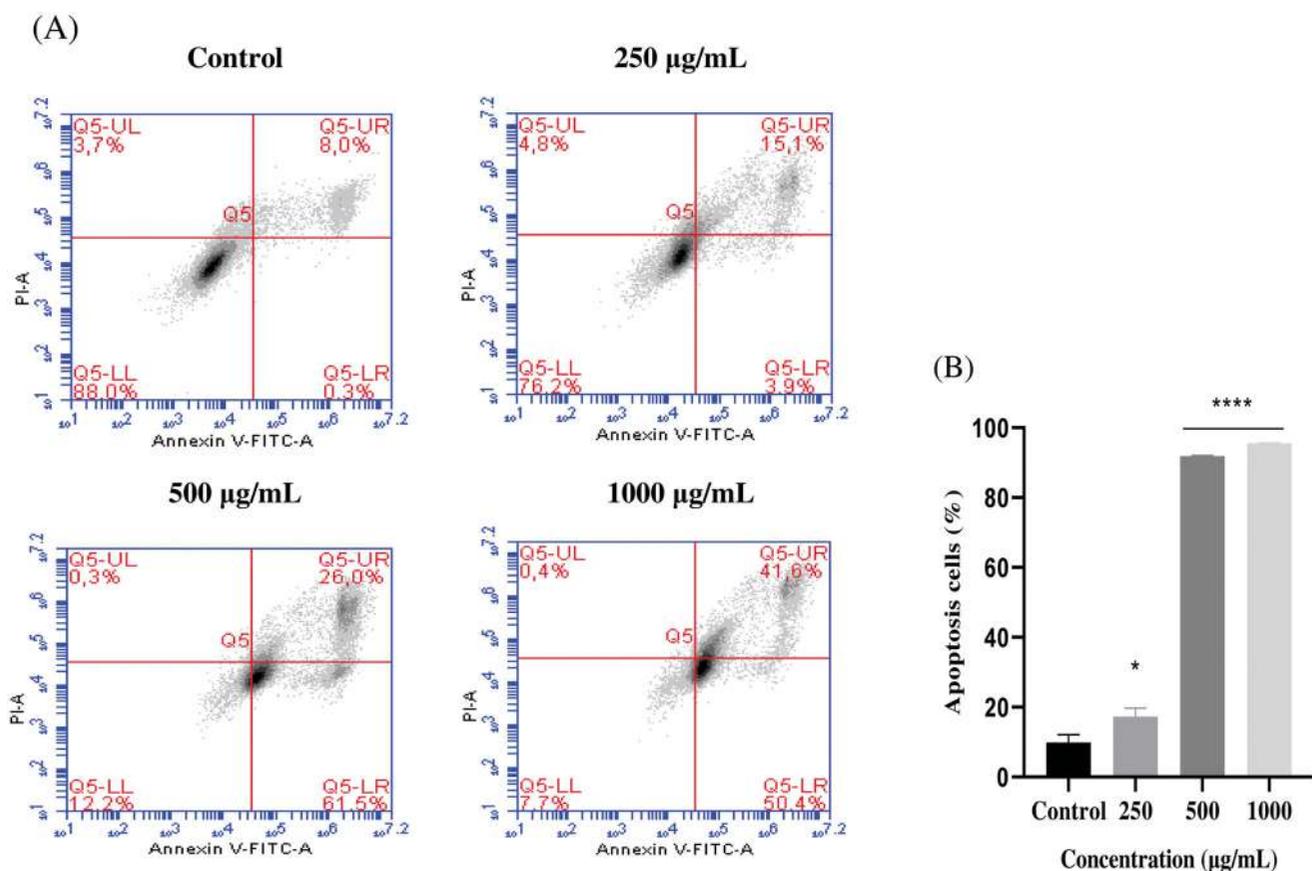


Figure 3. Induction of apoptosis by EAELN in PC3 cancer cells. (A) Representative histograms of cells sorted by flow cytometry. Cells were treated with the extract for 24 h at different concentrations (250, 500, and 1000 µg/mL) and stained with Annexin V-FITC and propidium iodide before sorting by flow cytometry. Cells in the Q5-UL, Q5-UR, Q5-LL and Q5-LR quadrants represent necrotic, late apoptotic, viable and early apoptotic populations, respectively. (B) Quantification of apoptotic cells. The percentage of apoptotic cells was calculated. Each bar represents the mean \pm SD ($n = 3$), * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, compared with control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's correction.

7.50 \pm 1.36% (control) to 18.73 \pm 0.67% (250 µg/mL), 18.29 \pm 0.12% (500 µg/mL), and 17.72 \pm 0.64% (1000 µg/mL), all $p < 0.0001$ compared with control (Figure 5A, B). Treatment with EAELT showed different effects in different phases of the cell cycle, with the percentage of cells in the S phase being reduced, while that of G0/G1 and G2/M phase increased significantly (Figure 6A, B).

The percentage of cells in G0/G1 phase after EAELT treatment increased from 74.46 \pm 0.49% (control) to 72.35 \pm 1.20% (250 µg/mL, * $p < 0.05$), 77.36 \pm 1.38% (500 µg/mL, ** $p < 0.01$) and 78.58 \pm 0.37% (1000 µg/mL, **** $p < 0.0001$), respectively, and that of the G2/M phase increased from 6.25 \pm 0.92% (control) to 16.23 \pm 0.97% (250 µg/mL), 16.39 \pm 0.79% (500 µg/mL), and 15.80 \pm 1.32% (1000 µg/mL), respectively, all **** $p < 0.0001$ compared with control, whereas the percentage of cells in S phase was significantly reduced (**** $p < 0.0001$) from 19.29 \pm 1.39 (control) to 11.42 \pm 0.44 (250 µg/mL), 6.25 \pm 0.68 (500 µg/mL), and 5.62 \pm 1.1 (1000 µg/mL) (Figure 6A, B). The results showed that EAELN induced a significant cell cycle arrest in the G2/M phase, while an arrest in the G0/G1 and G2/M phases was observed in PC3 cells after exposure to various concentrations of EAELT, for 24 h.

LC-HRMS/MS analyses of EAELN and EAELT

With the aim to analyse the phytochemical composition of EAELN and EAELT we conducted UHPLC-DAD-ESI/HRMS-MS. The latter revealed the presence of 75 compounds (Table 2

and Figure 7A, B) in each extract. The metabolites were identified using the GNPS platform. EAELN and EAELT showed the presence of polyphenols, terpenoids, alkaloids, polyketides, fatty acids, and carbohydrates. The most important classes were flavones (23 compounds) and hydroxycinnamic acids (17 compounds).

Compounds detected in EAELN

Forty flavonoids (flavones, flavonols, isoflavones, neoflavonoid, chalcones, and one anthocyanidin) were detected. The major compounds were vicenin-2 isomer 1 (4), vitexin (37), trihydroxyflavone (74), homoorientin (27), vicenin-2 isomer 4 (21), vicenin-2 isomer 12 (12), vicenin-2 isomer 3 (16), cirsiol (64), tricetin-5-glucoside isomer 2 (66), 5,3'-dihydroxyflavone (17), luteolin (51), orientin isomer 1 (25), with respective percentages 8.08, 7.53, 6.70, 5.58, 5.17, 4.75, 4.67, 3.52, 3.38, 2.80, 2.61, and 2.54%. Four lignans, lanicepside B (14), olivil 4'-O-glucoside (15), a phenylanthralene (69), and the major compound podophylotoxin- β -D-glucoside (71) with a percentage of 4.41%, were detected. In addition, 19 phenolic acids, from which 17 hydroxycinnamic acids and two hydroxybenzoic acids were detected with chicoric acid (24) as the major compound (8.19%). The analyses also showed the presence of one phenylethanoid (30) and one coumarin derivative (55), besides other compounds including one carbohydrate, melibiose (1), one alkaloid (26), two polyketides (50 and 75), three terpenoids (62, 68 and 76), and three fatty acids (65, 77 and 78) (Table 2).

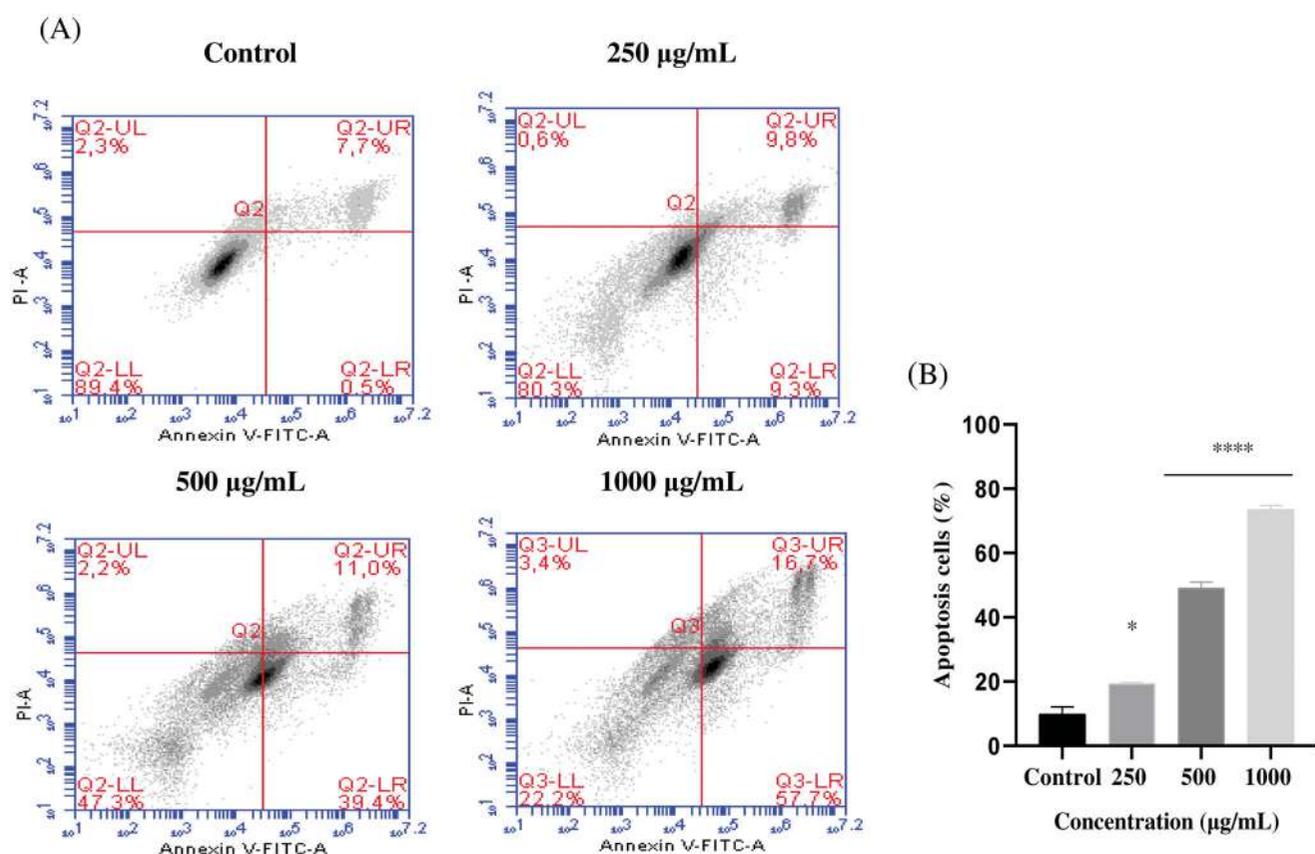


Figure 4. Induction of apoptosis by EAELT in the PC3 cancer cell. (A) Representative histograms of cells sorted by flow cytometry. Cells were treated with the extract for 24 h at different concentrations (250, 500, and 1000 µg/mL) and stained with Annexin V-FITC and propidium iodide before sorting by flow cytometry. Cells in the Q5-UL, Q5-UR, Q5-LL and Q5-LR quadrants represent necrotic, late apoptotic, viable and early apoptotic populations, respectively. (B) Quantification of apoptotic cells. The percentage of apoptotic cells was calculated. Each bar represents the mean \pm SD ($n = 3$), * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, compared with control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's correction.

Compounds detected in EAELT

Forty flavonoids (flavones, flavonols, isoflavones, neoflavonoid, chalcone, and anthocyanidin) were detected with homoorientin (27), cirsiolol (64), tetrahydroxyflavone (72), 2"-O- β -D-xylopyranosylorientin (8), hyperoside (43), vicenin-2 isomer1 (4), quercitrin (58), and vitexin (37) as major compounds with respective percentages of 9.21, 8.24, 4.36, 4.05, 3.87, 3.50, 3.35, and 2.93%. The same lignans (14, 15, 69, and 71) as those detected in EAELN, were also found in EAELT together with nineteen phenolic acids (17 hydroxycinnamic acids and two hydroxybenzoic acids) namely, 4-caffeoylquinic acid (10), chlorogenic acid (2), 3-O-coumaroylquinic acid isomer 2 (19), 3-O-feruloylquinic acid isomer 2 (23), 4,5-dicaffeoylquinic acid isomer 2 (44), 4,5-dicaffeoylquinic acid isomer 1 (33), and methyl chlorogenate isomer 1 (9) with respective percentages of 10.51, 7.44, 4.63, 3.85, 3.55, 3.05, and 2.97%. The same other compounds (30, 55, 1, 26, 50, 75, 62, 68, 76, 65, 77, and 78) (Table 2), belonging to different phytochemical classes, which were detected in EAELN, also characterised the EAELT.

Discussion

Medicinal plants are important sources for the development of effective anticancer agents. Currently, many drugs available on pharmacy shelves are either natural products or their derivatives (Mukherjee et al. 2001; Khan 2014; Ijaz et al. 2018).

Species of *Linum* genus are known to induce anticancer activity (Hartwell 1982). The present study examined, for the first

time, the ability of EAELN and EAELT to inhibit cancer cell proliferation, block the cell cycle and induce apoptosis which is known to be the most promising routes to treat cancer (Hanahan and Weinberg 2000; Ghobrial et al. 2005). In addition, the secondary metabolites of EAELN and EAELT were analysed by LC-HRMS/MS to determine the relationship between their anticancer activity and their chemical composition.

The results of our study showed, for the first time, that EAELN and EAELT inhibited the proliferation of PC3 and MDA-MB-231 cells significantly in a concentration-dependent manner (Figures 1 and 2). This could be explained by the presence of polyphenols such as flavonoids, phenolic acids, and lignans in both extracts. Polyphenols could exert anticancer effects through different mechanisms, including modification of cell signalling, inhibition of cell proliferation, induction of cell cycle arrest, and apoptosis (Spatafora and Tringali 2012; Abbas et al. 2017). Therefore, the current study suggests that polyphenols, detected in the extracts, may exhibit anticancer activity by inducing apoptosis and blocking the cell cycle at different stages. EAELN had the highest antiproliferative activity against PC3 (IC₅₀ 133.2 \pm 5.73 µg/mL) and MDA-MB-231 lines (IC₅₀ 156.9 \pm 2.83 µg/mL) which could be due to the difference in chemical contents and their concentration in the two extracts.

Apoptosis plays an essential role in cellular homeostasis; nevertheless, abnormal apoptosis is a pathological process (Xiang et al. 2016). Tumour formation is the result of the loss of balance between cell proliferation and apoptosis. Induction of apoptosis is known to be a promising strategy to treat cancer (Schulze-Bergkamen and Krammer 2004). Previous research has shown

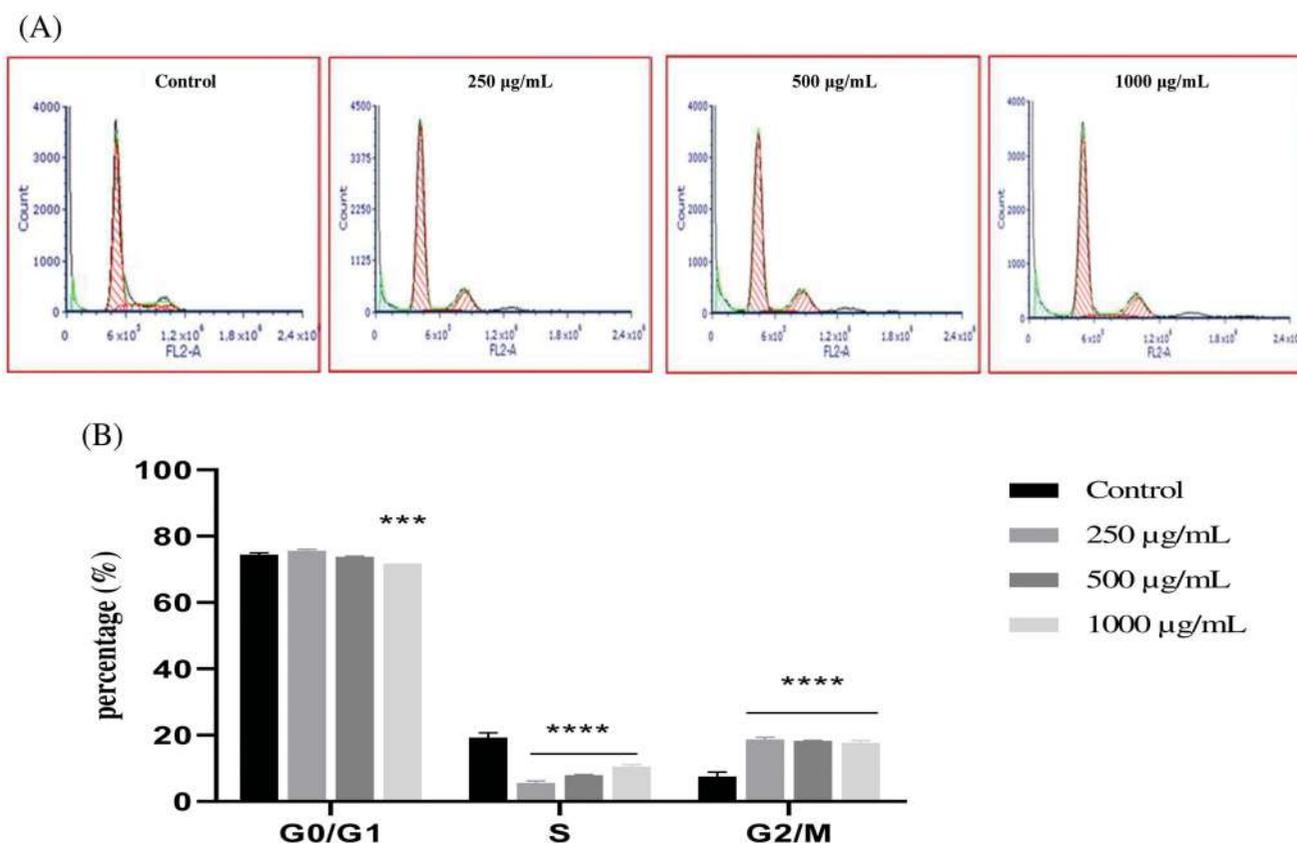


Figure 5. The effect of EAELN on cell cycle distribution in PC3 cell lines. The PC3 cell line was incubated for 24 h with the extract at different concentrations (250, 500 and 1000 µg/mL). (A) Flow cytometry analysis of cell distribution is represented by PI fluorescence histograms. The experiment was repeated three times. (B) The percentages of cells in the different phases are shown in the bar graph. With increasing extract concentration, the number of cells in the G2/M phase increased while that in the G0/G1 and S phase decreased. EAELN blocks cells in the G2/M phase. Data are presented as means \pm SD ($n=3$), *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared with control. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's correction.

that the antiproliferative effect of naturally occurring products is associated with the induction of apoptosis in cancer cells (Chidambara Murthy et al. 2011; Park et al. 2011; Zhong et al. 2011). To determine whether the antiproliferative effect of EAELN and EAELT was due to apoptosis, treated PC3 cells were stained with Annexin V and PI and analysed by flow cytometry. Analysis of PC-3 cells treated with EAELN and EAELT suggested apoptotic activity, evidenced by the accumulation of early and late apoptotic cells.

The present study showed that EAELN and EAELT induce a significant antiproliferative effect associated with apoptosis. The apoptotic effect of EAELN on the PC3 line was higher than that of EAELT (Figures 3A, B and 4A, B). The effect induced by EAELN can be attributed to its major bioactive compounds and other compounds present in the extract by a direct and also synergistic effect. These data strongly support previous research on *Linum* species as new sources for candidate anticancer drugs (Amirghofran et al. 2006; Mohammed et al. 2010; Alejandre-García et al. 2015; Akbari Asl et al. 2018).

The cell cycle plays a primary role in controlling cancer cell proliferation and cell cycle dysregulation is a fundamental feature of cancers (Vermeulen et al. 2003; Otto and Sicinski 2017). Natural products that can disrupt the cell cycle are the most commonly used anticancer drugs (Paier et al. 2018).

Therefore, the ability of EAELN and EAELT to block the cell cycle of PC3 cells was examined. Our results showed that EAELN induced a significant cell cycle arrest in the G2/M phase (Figure 4A, B), while an arrest in the G0/G1 and G2/M phases was observed in PC3 cells after exposure to various

concentrations of EAELT, for 24 h (Figure 5A, B). The two extracts exhibited a different cell cycle arrest pattern.

The different observed patterns of cell cycle arrest as a pharmacological endpoint indicate the involvement of several mechanisms of action, suggesting the involvement of compounds in each extract in mediating this activity. Our results support the idea that the extracts inhibit cancer cell proliferation by inhibiting cell cycle progression, raising the possibility that the extract may be a potential therapeutic agent.

In this study, we showed, for the first time that, EAELN and EAELT exert anticancer activity through cell cycle arrest and induction of apoptosis. Interestingly, although both species belong to the same genus, the anticancer effect of EAELN was higher than that of EAELT. It was, therefore, necessary to conduct chemical analyses to reveal the molecules responsible for this activity. Therefore, LC-HRMS/MS analyses were necessary to investigate the structure-activity relationship and to compare the constituents of the two extracts. LC-HRMS/MS analyses of EAELN and EAELT are reported here for the first time, the profiling of these extracts showed the presence of compounds known for their anticancer activity. The anticancer activity induced by EAELN might be due to the major compounds detected namely, chlorogenic acid (8.19%), vicenin-2 isomer 1 (8.08%), vitexin (7.53%), trihydroxyflavone (6.70%), homoorientin (5.58%), vicenin-2 isomer 4 (5.17%), vicenin-2 isomer 2 (4.75%), vicenin-2 isomer 3 (4.67%), podophyllotoxin- β -D-glucoside (4.41%), melibiose (3.97%), cirsiolol (3.52%), triclin 5-glucoside isomer 1 (3.38%), 5,3'-dihydroxyflavone (2.80%), luteolin (2.61%), and orientin isomer 1 (2.54%) (Table 2 and Figure 7A).

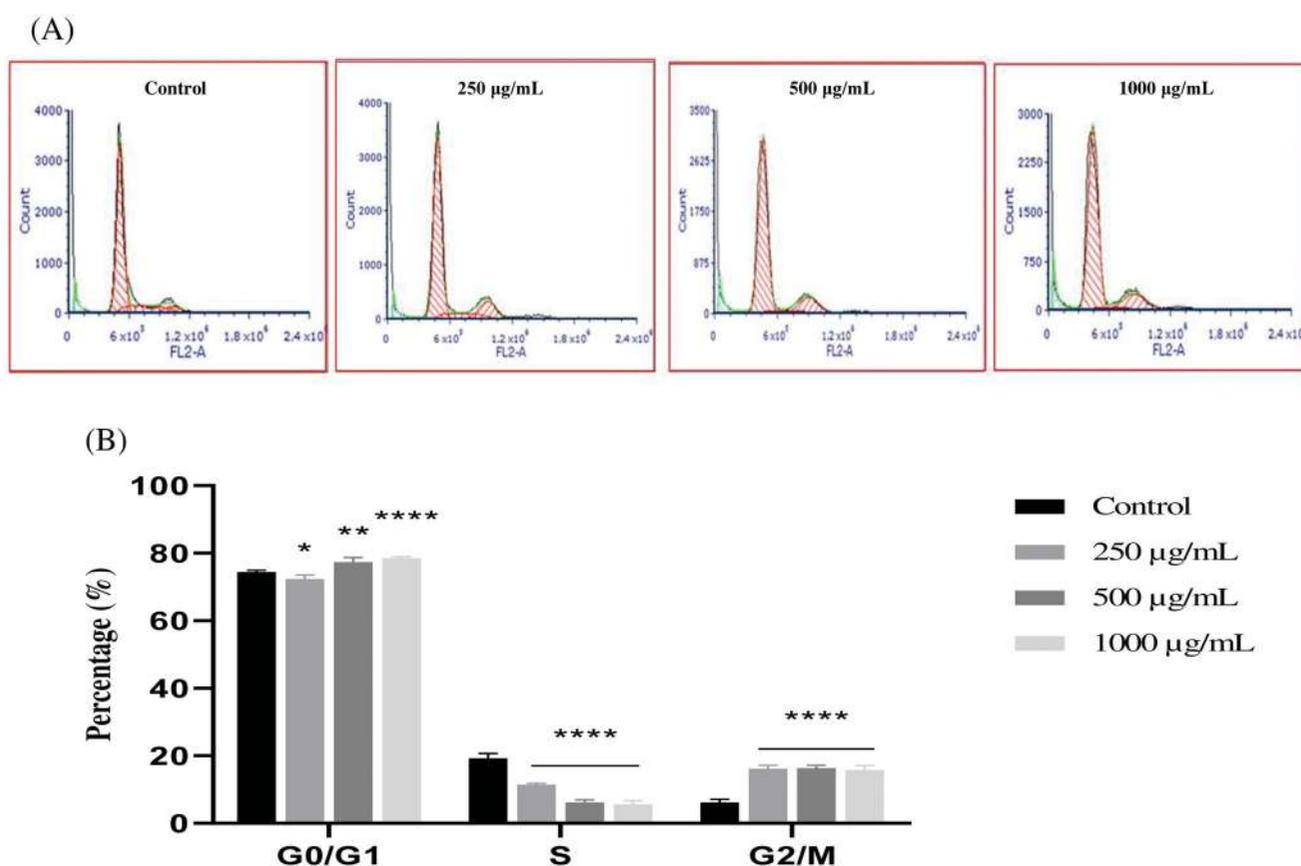


Figure 6. The effect of EAELT on cell cycle distribution in PC3 cell lines. The PC3 cell line was incubated for 24 h with the extract at different concentrations (250, 500, and 1000 µg/mL). (A) Flow cytometry analysis of cell distribution is represented by PI fluorescence histograms. The experiment was repeated three times. (B) The percentages of cells in the different phases are shown in the bar graph. With increasing extract concentration, the number of cells in the G0/G1 and G2/M phase increased while that in the S phase decreased. EAELT extracts blocked cells in G0/G1 and G2/M phases. Data are presented as means \pm SD ($n = 3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, compared with control. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's correction.

Similarly, the anticancer activity induced by EAELT might be due to the presence of major compounds namely, 4-caffeoylquinic acid (10.51%), homoorientin (9.21%), cirsiolol (8.24%), chlorogenic acid (7.44%), 3-*O*-coumaroylquinic acid isomer 2 (4.63%), tetrahydroxyflavone (4.36%), 2''-*O*- β -D-xylopyranosylorientin (4.05%), hyperoside (3.87%), 3-*O*-feruloylquinic acid isomer 2 (3.85%), 4,5-dicaffeoylquinic acid isomer 2 (3.55%), vicenin-2 isomer 1 (3.50%), quercitrin (3.35%), 4,5-dicaffeoylquinic acid isomer 1 (3.05%), methyl chlorogenate isomer 1 (2.97%), and vitexin (2.93%) (Table 2 and Figure 7B).

The anticancer effect of EAELN was higher than that of EAELT, this could be explained by its richness in chicoric acid (8.19%), vicenin-2 isomer 1 (8.08%), vitexin (7.53%), and podophyllotoxin- β -D-glucoside (4.41%) compared to EAELT, which presented lower levels of these compounds known for their anticancer activities. Indeed, it has been reported that chicoric acid has a strong growth inhibitory effect against HCT-116 colon cancer cells and effectively induces apoptosis, characterised by DNA fragmentation, caspase-9 activation, PARP cleavage, and β -catenin downregulation (Tsai et al. 2012). Its anticancer activity on the MCF-7 cell line has also been noted (Huntimer et al. 2006). Vicenin-2 has also been reported to have numerous pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects (Ku and Bae 2016; Yang et al. 2018). Studies by Nagaprashantha et al. (2011) have also shown that vicenin-2 induces antiangiogenic, pro-apoptotic and antiproliferative inhibition of prostate cancer cells. Vicenin-2 also inhibits HT-29 colon cancer cell proliferation by inhibiting the WNT/ β -catenin

signalling pathway, inducing apoptosis, and leading to the arrest of HT-29 cells in the G2/M phase. Furthermore, treatment with vicenin-2 increases the expression of apoptosis-associated proteins Bax, cytochrome c, and caspase-3, and decreases that of Bcl-2 (Yang et al. 2018). Vitexin is a naturally occurring flavonoid compound that exhibits antioxidant (An et al. 2012), anticancer and neuroprotective properties (Zhu et al. 2016). Recently, vitexin has attracted the attention of many researchers for its potential antitumor properties. This compound has shown an antitumor effect against various cancers, including breast, prostate, and ovarian cancers, by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of cancer cells (Zhou et al. 2009; He et al. 2016; Ganesan and Xu 2017). Zhou et al. (2009) reported that vitexin inhibited the proliferation of prostate, breast and ovary cancer cells and induced apoptosis by activating caspases and decreasing the Bcl-2/Bax ratio. Vitexin has been shown to induce G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis by affecting the Akt/mTOR signalling pathway in human glioblastoma cells and non-small cell lung carcinoma (Zhang et al. 2018; Liu et al. 2019). Moreover, podophyllotoxin glycosides and their derivatives are considered to lead compounds for anticancer drug development. The podophyllotoxin- β -D-glucoside compound exhibits more potent cytotoxic activity than the control drug (etoposide) in various cancer cell lines (PC-3, HeLa, HCT-116, HEK-293, and MCF-7) (Zilla et al. 2014). It has also been noted for its cytotoxic activity in other human cancer cell lines, HL-60, SMMC-7721, A-549, and SW480 (Zi et al. 2019). Podophyllotoxin and its derivatives exhibit anticancer activity, mainly due to its ability to

Table 2. Compounds characterised by LC-RHMS/MS analyses of ethyl acetate extracts of *L. numidicum* (EAE LN) and *L. trigynum* (EAE LT).

No.	Compounds	Rt (min)	m/z (molecular ion)	Intensity (EAE LN)	Intensity (EAE LT)
1	Melibiose	4.99	365.1138	147 929 531 (3.97%)	147 978 181 (2.36%)
2	Chlorogenic acid	18.02	355.1008	19 830 953 (0.53%)	466 338 325 (7.44%)
3	Caffeoylquinic acid	18.4	353.0862	2 047 497 (0.05%)	76 620 264 (1.22%)
4	Vicenin-2 isomer1	18.94	595.1646	300 955 606 (8.08%)	219 732 570 (3.50%)
5	Feruloyltyramine	19.07	265.1540	157 369 (0.004%)	0
6	3-O-Coumaroylquinic acid isomer 1	19.17	339.1057	1 531 302 (0.04%)	77 287 147 (1.23%)
7	Melilotoside	19.2	371.0967	21 984 718 (0.59%)	19 742 885 (0.31%)
8	2''-O-β-D- Xylopyranosylorientin	19.70	581.1491	429 950 (0.01%)	253 972 376 (4.05%)
9	Methyl chlorogenate isomer 1	20.30	369.1171	2 903 253 (0.08%)	185 972 948 (2.97%)
10	4-Caffeoylquinic acid	20.4	353.0863	32 305 715 (0.87%)	658 912 290 (10.51%)
11	7,2'-Dihydroxyflavone	20.5	253.0708	19 377 588 (0.52%)	7 639 462 (0.12%)
12	Vicenin-2 isomer 2	20.7	593,1488	176 871 262 (4.75%)	2 946 784 (0.05%)
13	3-O-Feruloylquinic acid isomer 1	21.0	367,1017	1 330 959 (0.04%)	174 112 107 (2.78%)
14	Lanicepside B	21.36	561.1933	683 831 (0.02%)	1 511 690 (0.02%)
15	Olivil 4'-O-β-D-glucoside	21.5	583.2010	2 205 970 (0.06%)	1 187 665 (0.02%)
16	Vicenin-2 isomer 3	21.6	593.1488	173 733 674 (4.67%)	108 801 687 (1.74%)
17	5,3'-Dihydroxyflavone	21.7	253.0708	104 431 411 (2.80%)	30 222 840 (0.48%)
18	Coumaroyl-O-β-D-fructofuranosyl-α-D-glucopyranoside	21.8	487.1436	0	10 332 606 (0.16%)
19	3-O-Coumaroylquinic acid isomer 2	22.05	337.0916	12 392 332 (0.33%)	290 472 234 (4.63%)
20	Luteolin-7,3'-di-O-β-D-glucoside	22.1	609.1438	4 642 826 (0.12%)	2 201 017 (0.04%)
21	Vicenin-2 isomer 4	22.4	593.1488	192 586 754 (5.17%)	9 952 840 (0.16%)
22	Methyl chlorogenate isomer 2	22.44	369.1171	1 751 179 (0.05%)	2 924 904 (0.05%)
23	3-O-Feruloylquinic acid isomer 2	22.5	367.1020	3 479 096 (0.09%)	241 714 645 (3.85%)
24	Chicoric acid	22.8	473.0705	305 001 876 (8.19%)	7 778 556 (0.12%)
25	Orientin isomer 1	22.85	449.1066	94 546 115 (2.54%)	138 356 303 (2.21%)
26	cis-Zeatin-O-glucoside	22.86	382.1849	3 651 063 (0.1%)	37 911 888 (0.60%)
27	Homoorientin	23.0	447.0912	207 820 192 (5.58%)	577 624 518 (9.21%)
28	Quercetin-3-methoxy-3'-O-glucoside isomer 1	23.05	479.1173	40 490 115 (1.09%)	16 892 786 (0.27%)
29	Orientin isomer 2	23.2	447.0914	15 986 955 (0.43%)	24 045 527 (0.38%)
30	2-Phenylethyl 3-O-(4-carboxy-3-hydroxy-3-methylbutanoyl)-β-D-glucopyranoside	23.40	451.1607	92 875 737 (2.49%)	7 558 907 (0.12%)
31	Tricin 5-glucoside isomer 1	23.45	493.1326	125 814 691 (3.38%)	8 039 417 (0.13%)
32	8-C-Disaccharide genistein	23.53	565.1543	80 548 (0.002%)	426 027 (0.007%)
33	4,5-Dicaffeoylquinic acid isomer 1	23.7	515.1211	45 099 159 (1.21%)	191 156 967 (3.05%)
34	Methyl chlorogenate isomer 3	23.8	367.1020	448 454 (0.01%)	8 051 002 (0.13%)
35	3,4-Dimethoxydalbergione	23.81	285.1220	70 272 437 (1.89%)	20 260 632 (0.32%)
36	Isovitexin	24.10	433.1117	31 735 817 (0.85%)	23 075 317 (0.37%)
37	Vitexin	24.2	431.0966	280 284 714 (7.53%)	183 668 390 (2.93%)
38	Isovitexin 2''-O-arabinoside	24.24	563.1388	42 646 (0.001%)	173 177 (0.003%)
39	6-(3-Benzoyloxy-2-hydroxypropoxy)-glucuronic acid	24.4	371.0970	263 066 (0.007%)	309 401(0.005%)
40	Kaempferol-7-O-hexoside	24.36	447.0915	31 103 555 (0.84%)	28 574 403 (0.46%)
41	Swertisin	24.45	445.1131	124 569 (0.003%)	21 234 562 (0.34%)
42	Vitexin-2''-rhamnoside	24.5	577.1544	1 303 151 (0.03%)	797 971 (0.01%)
43	Hyperoside	24.54	463.0864	23 074 096 (0.62%)	242 440 610 (3.87%)
44	4,5-Dicaffeoylquinic acid isomer 2	24.8	515.1175	41 362 870 (1.11%)	222 450 268 (3.55%)
45	Ellagic acid	24.9	300.9979	309 652 (0.008%)	3 654 427 (0.06%)
46	Violanthin	25.0	577.1542	696 722 (0.02%)	740 181 (0.01%)
47	Rutin	25.0	609.1437	0	365 553 (0.006%)
48	Guajavarin	25.1	433.0761	2 713 340 (0.07%)	27 315 611 (0.44%)
49	Spiraeoside	25.2	463.0858	814 062 (0.02%)	3 077 180 (0.05%)
50	Dihydroinfectopyrone	25.20	267.1197	79 404 224 (2.13%)	15 136 125 (0.24%)
51	Luteolin	25.37	287.0544	97 253 530 (2.61%)	153 192 910 (2.44%)
52	Rosmarinic acid	25.4	359.0753	46 168 506 (1.24%)	31 520 285 (0.50%)
53	Malvidin 3-O-β-galactoside	25.44	493.1326	545 776 (0.01%)	1 106 293 (0.02%)
54	Quercetin-3-methoxy-3'-O-glucoside isomer2	25.5	477.1020	31 418 799 (0.84%)	24 295 807 (0.39%)
55	5-O-β-D-Glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin	25.51	463.1225	1 076 001 (0.03%)	4 154 266 (0.07%)
56	Afzelin	25.52	433.1119	84 417 798 (2.27%)	4 951 453 (0.08%)
57	Luteolin-7-O-β-D-glucoside	25.74	449.1066	1 673 218 (0.04%)	9 548 581 (0.15%)
58	Quercitrin	25.9	447.0913	88 111 709 (2.37%)	210 096 500 (3.35%)
59	Isorhamnetin 3-O-β-D-galactoside	26.0	477.1019	8 038 853 (0.22%)	20 374 345 (0.32%)
60	8,3',4'-Trihydroxyflavone-7-O-6(6''-O-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside	26.3	593.1487	75 785 (0.002%)	0
61	3-O-Coumaroylquinic acid isomer 3	26.32	337.0917	551 064 (0.01%)	69 834 551 (1.11%)
62	Foliasalacioside B1	26.50	527.2462	2 494 169 (0.07%)	2 093 539 (0.03%)
63	Genkwanin	26.59	285.0752	10 742 814 (0.29%)	476 146 (0.008%)
64	Cirsiliol	26.60	331.0804	130 903 808 (3.52%)	516 457 072 (8.24%)
65	9-(2,3-Dihydroxypropoxy)-9-oxononanoic acid	26.7	261.1334	4 813 192 (0.13%)	2 570 671 (0.04%)
66	Tricin 5-glucoside isomer 2	26.9	491.1174	16 112 666 (0.43%)	43 903 953 (0.70%)
67	Methoxy-quercetin-3-O-hexoside	27.4	477.1016	49 158 (0.001%)	0
68	Blumenol C glucoside	27.44	373.2212	5 616 862 (0.15%)	4 813 282 (0.08%)
69	4-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-6,7-dihydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid	27.7	311.0551	18 083 364 (0.49%)	4 622 489 (0.07%)
70	Phlorhizin	28.0	435.1288	906 364 (0.02%)	36 104 719 (0.58%)
71	Podophyllotoxin-β-D-glucoside	28.1	621.1804	164 285 959 (4.41%)	299 083 (0.005%)

(continued)

Table 2. Continued.

No.	Compounds	Rt (min)	m/z (molecular ion)	Intensity (EAELN)	Intensity (EAELT)
72	Tetrahydroxyflavone	28.4	285.0394	249 356 019 (6.70%)	273 110 205 (4.36%)
73	6,4'-dimethoxy scutellarein-7-neohesperidide	29.2	667.1756	0	859 816 (0.01%)
74	Trihydroxyflavone	29.6	269.0404	25 972 811 (0.70%)	4 631 461 (0.07%)
75	3-(2,6-Dihydroxyphenyl)-4-hydroxy-6-methyl benzofuranone	29.8	271.0604	2 623 339 (0.07%)	14 180 305 (0.23%)
76	Lactarofurin A	30.8	265.1453	2 422 100 (0.07%)	26 032 990 (0.42%)
77	12,13-Dihome	33.9	313.2372	1 598 402 (0.04%)	125 993 (0.002%)
78	α -Dimorphecolic acid	34.4	295.2266	9 540 392 (0.26%)	9 397 797 (0.15%)

EAELN, Ethyl acetate extract of *L. numidicum*; EAELT, Ethyl acetate extract of *L. trigynum*; RT, Retention time.

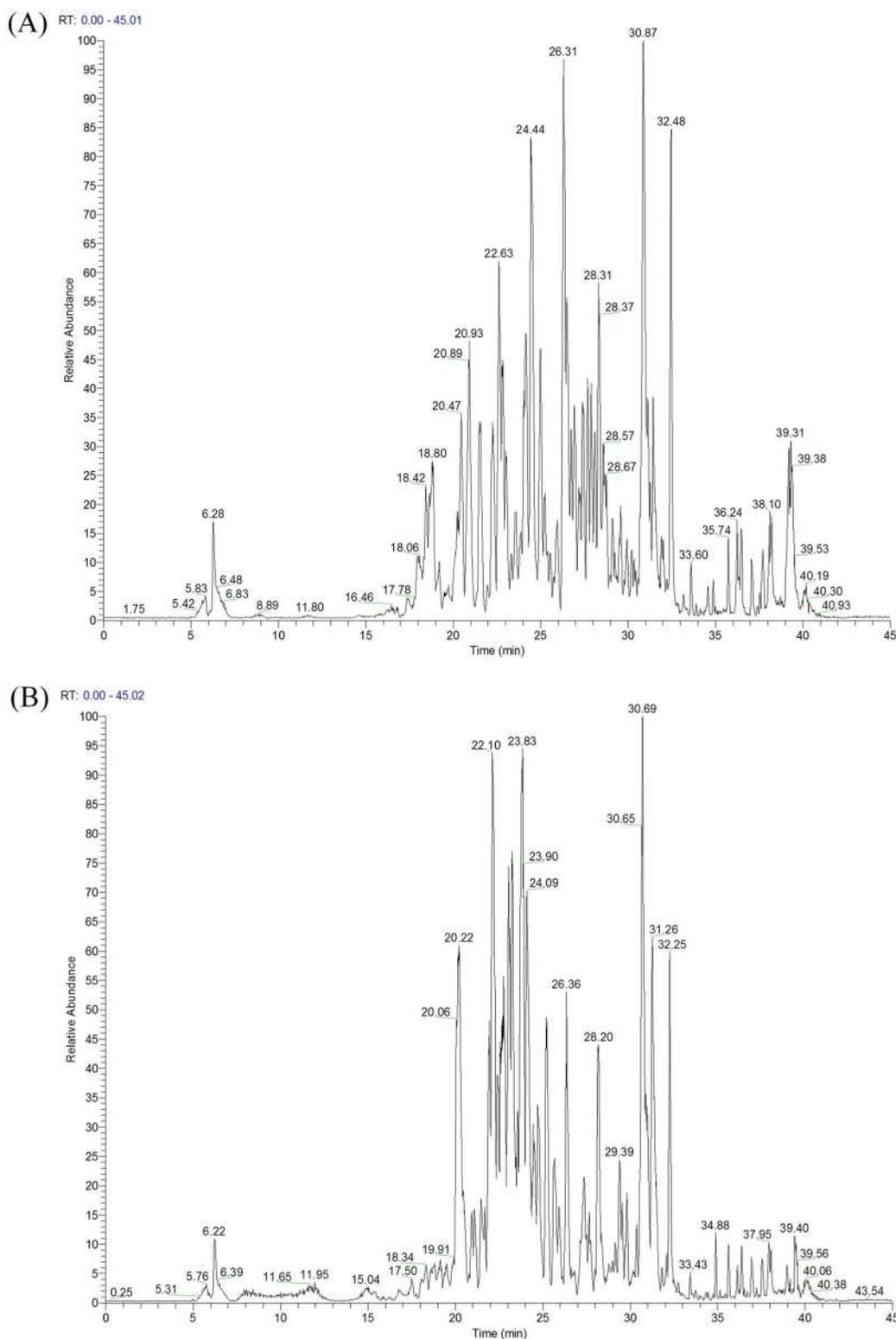


Figure 7. (A) LC – ESI – DDA – HRMS base peak chromatogram of EAELN in negative ion mode. (B) LC – ESI – DDA – HRMS base peak chromatogram of EAELT in negative ion mode.

inhibit tubulin polymerisation into microtubules (Kamal et al. 2014). It is obvious that the observed anticancer activity of the extract could be due to one or a mixture of the compounds highlighted above. Moreover, *in silico* studies regarding the interaction of the identified compounds with potential biological targets involved in cell proliferation could provide valuable information.

Conclusions

Our results demonstrated for the first time that ethyl acetate extracts of two *Linum* species, *L. numidicum* (EAELN) and *L. trigynum* (EAELT), inhibited the proliferation of PC3 and MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner. EAELN had the highest antiproliferative activity against both lines tested. EAELN and EAELT induced apoptosis of PC-3 cells; the apoptotic effect of EAELN was higher than that of EAELT extract. EAELN induced a significant cell cycle arrest in the G2/M phase, while an arrest in the G0/G1 and G2/M phases was observed after treatment with EAELT. In this study, we showed, for the first time, that EAELN and EAELT exert anticancer activity by inducing apoptosis and blocking the cell cycle. This could be due to the presence of phenolic compounds such as flavonoids, lignans and phenolic acids which were detected by LC-HRMS/MS. The anticancer effect of EAELN was higher than that of EAELT. The effect induced by EAELN could be attributed to its major bioactive compounds such as chicoric acid, vicenin-2, vitexin, and podophyllotoxin- β -D-glucoside and other compounds present in the extract by a direct and/or synergistic effect. EAELN can be considered as a source of phytochemicals to treat cancer. Owing that most of the detected compounds can be obtained from commercial sources, it is intended to test those of them that are known for their anticancer activity.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge DGRSDT-MESRS, Algeria and Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (LRB), France for financial support. The authors also thank M. Pezet and the IAB photonic imaging and flow cytometry facility (Microcell), member of the Life Science Imaging-in vitro and labeled by the French National Research Infrastructure IBISA.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

References

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. 2017. Natural polyphenols: an overview. *Int J Food Prop.* 20(8):1689–1699.
- Akbari Asl E, Fallah Mehrabadi J, Afshar D, Noorbazargan H, Tahmasebi H, Rahimi A. 2018. Apoptotic effects of *Linum album* extracts on AGS human gastric adenocarcinoma cells and ZNF703 oncogene expression. *Asian Pac J Cancer Prev.* 19:2911–2916.
- Alejandro-García I, Álvarez L, Cardoso-Taketa A, González-Maya L, Antúnez M, Salas-Vidal E, Díaz JF, Marquina-Bahena S, Villarreal ML. 2015. Cytotoxic activity and chemical composition of the root extract from the Mexican species *Linum scabrellum*: mechanism of action of the active compound 6-methoxypodophyllotoxin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:298463.
- Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. 2006. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J Cancer Res Clin Oncol.* 132(7):427–432.
- An F, Yang G, Tian J, Wang S. 2012. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regen Res.* 7(33):2565–2575.
- Ayres DC, Loike JD. 1990. Lignans: chemical, biological and clinical properties. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Kumar V, Rathore KS, Patil BS. 2011. Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis. *J Agric Food Chem.* 59(6):2314–2323.
- Ganesan K, Xu B. 2017. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review: anticancer mechanisms of vitexin and isovitexin. *Ann N Y Acad Sci.* 1401(1):102–113.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 55(3):178–194.
- Gurumurthy S, Vasudevan KM, Rangnekar VM. 2001. Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 20(3–4):225–243.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57–70.
- Hartwell JL. 1982. Plants used against cancer: a survey. Lawrence, MA: Quarterman Publications.
- He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng BW. 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia.* 115:74–85.
- Huncharek M, McGarry R, Kupelnick B. 2001. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res.* 21(1B):765–769.
- Huntimer ED, Halaweish FT, Chase CCL. 2006. Proliferative activity of *Echinacea angustifolia* root extracts on cancer cells: interference with doxorubicin cytotoxicity. *C&B.* 3(6):695–703.
- Ijaz S, Akhtar N, Khan MS, Hameed A, Irfan M, Arshad MA, Ali S, Asrar M. 2018. Plant derived anticancer agents: a green approach towards skin cancers. *Biomed Pharmacother.* 103:1643–1651.
- Iwasaki T, Kondo K, Kuroda T, Moritani Y, Yamagata S, Sugiura M, Kikkawa H, Kaminuma O, Ikezawa K. 1996. Novel selective PDE IV inhibitors as antiasthmatic agents. Synthesis and biological activities of a series of 1-aryl-2,3-bis(hydroxymethyl)naphthalene lignans. *J Med Chem.* 39(14):2696–2704.
- Jabir NR, Anwar K, Firoz CK, Oves M, Kamal MA, Tabrez S. 2018. An overview on the current status of cancer nanomedicines. *Curr Med Res Opin.* 34(5):911–921.
- Kamal A, Srinivasa Reddy T, Polepalli S, Shalini N, Reddy VG, Subba Rao AV, Jain N, Shankaraiah N. 2014. Synthesis and biological evaluation of podophyllotoxin congeners as tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 22(19):5466–5475.
- Khan H. 2014. Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 19(3):216–219.
- Ku SK, Bae JS. 2016. Vicenin-2 and scolymoside inhibit high-glucose-induced vascular inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Can J Physiol Pharmacol.* 94(3):287–295.
- Lee H, Venkataram Gowda Saralamma V, Kim S, Ha S, Raha S, Lee W, Kim E, Lee S, Heo J, Kim G. 2018. Pectolarigenin induced cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cell via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Nutrients.* 10(8):1043.
- Lee SK, Nam KA, Heo YH. 2003. Cytotoxic activity and G2/M cell cycle arrest mediated by antofine, a phenanthroindolizidine alkaloid isolated from *Cynanchum paniculatum*. *Planta Med.* 69(1):21–25.
- Liu X, Jiang Q, Liu H, Luo S. 2019. Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biol Res.* 52(1):7.
- Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21(3):485–495.
- Mohammed MMD, Chen M, Zhai L, Ibrahim NA. 2010. The cytotoxic activity of *Linum grandiflorum* leaves. *Eur J Chem.* 1(2):110–114.
- Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem.* 8(12):1467–1486.
- Nagaprasanthan LD, Vatsyayan R, Singhal J, Fast S, Roby R, Awasthi S, Singhal SS. 2011. Anticancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochem Pharmacol.* 82(9):1100–1109.
- Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod.* 70(3):461–477.

- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 66(7):1022-1037.
- Ojima I. 2008. Modern natural products chemistry and drug discovery. *J Med Chem.* 51(9):2587-2588.
- Otto T, Sicinski P. 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 17(2):93-115.
- Paier C, Maranhão SS, Carneiro TR, Lima LM, Rocha DD, Santos R, Farias KM, Moraes-Filho MO, Pessoa C. 2018. Natural products as new antimetabolic compounds for anticancer drug development. *Clinics.* 73(suppl 1): e813s.
- Park HS, Kim GY, Nam TJ, Deuk Kim N, Hyun Choi Y. 2011. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. *J Food Sci.* 76(3):T77-T83.
- Rogers CM. 1982. The systematics of *Linum* sect. *Linopsis* (Linaceae). *Pl Syst Evol.* 140(2-3):225-234.
- Schulze-Bergkamen H, Krammer PH. 2004. Apoptosis in cancer-implications for therapy. *Semin Oncol.* 31(1):90-119.
- Seyfried TN, Shelton LM. 2010. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab.* 7:7.
- Shibata MA, Hasegawa R, Kurata Y, Yamada M, Tamano S, Fukushima S. 1990. Bladder epithelial hyperplasia in F344 rats after intravesical instillation of the antitumor chemotherapeutic agents Adriamycin® and mitomycin C. *Cancer Lett.* 49(1):41-49.
- Spatafora C, Tringali C. 2012. Natural-derived polyphenols as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 12(8):902-918.
- Teles RHG, Morales HF, Cominetti MR. 2018. Global trends in nanomedicine research on triple negative breast cancer: a bibliometric analysis. *Int J Nanomed.* 13:2321-2336.
- Tsai YL, Chiu CC, Yi-Fu Chen J, Chan KC, Lin SD. 2012. Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. *J Ethnopharmacol.* 143(3): 914-919.
- Vasilev N, Ebel R, Edrada R, Fuss E, Alfermann A, Ionkova I, Petrova A, Reppinger M, Schmidt T. 2008. Metabolic profiling of lignan variability in *Linum* species of Section *Syllinum* native to Bulgaria. *Planta Med.* 74(3):273-280.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer: cell cycle regulation and deregulation. *Cell Prolif.* 36(3):131-149.
- Xiang P, He RW, Han YH, Sun HJ, Cui XY, Ma LQ. 2016. Mechanisms of housedust-induced toxicity in primary human corneal epithelial cells: oxidative stress, proinflammatory response and mitochondrial dysfunction. *Environ Int.* 89-90:30-37.
- Yang D, Zhang X, Zhang W, Rengarajan T. 2018. Vicenin-2 inhibits Wnt/ β -catenin signaling and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line. *Drug Des Devel Ther.* 12:1303-1310.
- Zhang G, Li D, Chen H, Zhang J, Jin X. 2018. Vitexin induces G2/M-phase arrest and apoptosis via Akt/mTOR signaling pathway in human glioblastoma cells. *Mol Med Rep.* 17:4599-4604.
- Zhou Y, Liu YE, Cao J, Zeng G, Shen C, Li Y, Zhou M, Chen Y, Pu W, Potters L, et al. 2009. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clin Cancer Res.* 15(16):5161-5169.
- Zhong Z, Chen X, Tan W, Xu Z, Zhou K, Wu T, Cui L, Wang Y. 2011. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 667(1-3): 50-55.
- Zhu Q, Mao LN, Liu CP, Sun YH, Jiang B, Zhang W, Li JX. 2016. Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. *Sci Rep.* 6:19266.
- Zi CT, Yang L, Kong QH, Li HM, Yang XZ, Ding ZT, Jiang ZH, Hu JM, Zhou J. 2019. Glucoside derivatives of podophyllotoxin: synthesis, physicochemical properties, and cytotoxicity. *DDDT.* 13:3683-3692.
- Zilla MK, Nayak D, Amin H, Nalli Y, Rah B, Chakraborty S, Kitchlu S, Goswami A, Ali A. 2014. 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside isolated from *Podophyllum hexandrum* exhibits potential anticancer activities by altering Chk-2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 224:100-107.

Résumé

Dans cette étude, l'extrait acétate d'éthyle de deux espèces de *Linum*, *L. numidicum* Murb. (EAELN) et *L. trigynum* L. (EAELT) et les fractions de chromatographie liquide sous vide (VLC) de l'extrait *n*-BuOH de *L. numidicum* Murb. (EBLN) ont été examinés, pour la première fois, pour leur capacité antioxydante, anticholinestérase et anticancéreuse. La composition en métabolites secondaires a été analysée par LC-HRMS/MS.

Les effets antioxydants de l'EAELN et l'EAELT ont été évalués *in vitro* par plusieurs méthodes complémentaires (DPPH, ABTS, CUPRAC, phénanthroline, et piégeage des radicaux galvinoxyles). L'activité anticholinestérase a été déterminée par la mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE). L'effet antiprolifératif de l'EAELN, l'EAELT et des fractions VLC contre les lignées PC3 et MDA-MB-231 a été évalué par le test MTT. L'apoptose des cellules PC3 a été détectée par coloration à l'annexine V-FITC/IP, le cycle cellulaire a été déterminé à l'aide d'un kit de détection (IP/RNase) et le contenu en ADN des cellules a été quantifié à l'aide d'un cytomètre en flux.

Les résultats de l'activité antioxydante ont montré pour la première fois que l'EAELN et l'EAELT exercent une activité antioxydante. L'EAELN a montré une meilleure activité par rapport à l'EAELT, cela pourrait s'expliquer par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes qui ont été identifiés par LC-HRMS/MS. Cependant ; l'EAELN et l'EAELT ont présenté une faible activité anticholinestérase par rapport au standard galantamine. L'EAELN et l'EAELT exercent une activité anticancéreuse en induisant l'apoptose et en bloquant le cycle cellulaire. L'EAELN a manifesté les activités antiproliférative et apoptotique les plus élevées contre les lignées testées. Les fractions VLC les plus actives (F1 et F6) de l'EBLN exercent une activité anticancéreuse en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose. Le profil LC-HRMS/MS des extraits a révélé la présence de composés connus qui pourraient être responsables des activités antioxydante et anticancéreuse observées.

L'EAELN, F1 et F6 peuvent être utilisés comme une excellente source de substances phytochimiques antioxydantes et anti-cancéreuses.

Mots clés : *L. numidicum* Murb. ; *Linum trigynum* L. ; activité antioxydante ; activité anticholinestérase ; activité anticancéreuse ; profil phytochimique.

Abstract

In this study, the ethyl acetate extract of two *Linum* species, *L. numidicum* Murb. (EAELN) and *L. trigynum* L. (EAELT) and the vacuum liquid chromatography (VLC) fractions of *n*-BuOH extract of *L. numidicum* Murb. (BELN) were examined, for the first time, for their antioxidant, anticholinesterase and anticancer capacity. The composition of secondary metabolites was analyzed by LC-HRMS/MS.

The antioxidant effects of EAELN and EAELT were evaluated *in vitro* by several complementary methods (DPPH, ABTS, CUPRAC, phenanthroline, and galvinoxyl radical scavenging). The anticholinesterase activity was determined by measuring the enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The antiproliferative effect of EAELN, EAELT and VLC fractions against PC3 and MDA-MB-231 lines was evaluated by MTT assay. Apoptosis of PC3 cells was detected by annexin V-FITC/PI staining, cell cycle was determined using a detection kit (PI/ RNase), and cell DNA content was quantified using a flow cytometer.

The antioxidant activity results showed for the first time that both EAELN and EAELT exert antioxidant activity. EAELN showed better activity compared to EAELT, this could be explained by its richness in polyphenols and flavonoids which were identified by LC-HRMS/MS. However; EAELN and EAELT showed low anticholinesterase activity compared to the galantamine standard. EAELN and EAELT exerted anticancer activity by inducing apoptosis and blocking the cell cycle. EAELN showed the highest antiproliferative and apoptotic activities against the tested lines. The most active VLC fractions (F1 and F6) of BELN exerted anticancer activity by inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. The LC-HRMS/MS profile of the extracts revealed the presence of known compounds that could be responsible for the observed antioxidant and anticancer activities.

EAELN, F1 and F6 can be used as an excellent source of antioxidant and anti-cancer phytochemicals.

Key words: *L. numidicum* Murb.; *Linum trigynum* L.; antioxidant activity; anticholinesterase activity, anticancer activity, phytochemical profile.

في هذه الدراسة , مستخلصات أسيتات الايثيل لنوعين من نبات *Linum* (EAELN), *L. numidicum* Murb. و *L. trigynum* L. (EAELT) وكذلك كسور كروماتوغرافيا السائل الفراغية (VLC) لمستخلص البوتانول لنبات *L. numidicum* Murb. (BELN) تمت دراستها لأول مرة لقدرتها على مقاومة السرطان والأكسدة وانزيم الكولين استراز. تم تحليل تكوين المستقلبات الثانوية بواسطة LC-HRMS/MS .

تم تقييم التأثيرات المضادة للأكسدة لـ EAELN و EAELT من خلال عدة طرق تكميليلية DPPH, ABTS, CUPRAC, phenanthroline, galvinoxyl radical scavenging) تم تحديد النشاط المضاد للكولين استراز عن طريق قياس النشاط الأنزيمي acetylcholinesterase (AChE) و butyrylcholinesterase (BChE) . تم تقييم التأثير المضاد للتكاثر لـ EAELN و EAELT و كسور VLC ضد الخلايا السرطانية PC3 و MDA-MB-231 من خلال اختبار MTT. تم الكشف عن موت الخلايا المبرمج لخلايا PC3 عن طريق التلوين Annexin V-FITC/PI، وتم تحديد دورة الخلية باستخدام مجموعة الكشف (PI/RNase) وتم قياس محتوى الحمض النووي للخلايا باستخدام مقياس التدفق الخلوي.

أظهرت نتائج نشاط مضادات الأكسدة لأول مرة أن EAELN و EAELT يمارسان نشاطاً مضاداً للأكسدة. أظهر EAELN نشاطاً أفضل مقارنةً بـ EAELT، ويمكن تفسير ذلك من خلال ثرائه في مادة البوليفينول والفلافونويد التي تم تحديدها بواسطة LC-HRMS/MS . أظهر كل من EAELN و EAELT نشاطاً ضعيفاً مضاداً للكولين استراز مقارنةً بالجالانتامين القياسي. يمارس كل من EAELN و EAELT نشاطاً مضاداً للسرطان عن طريق إحداث موت الخلية المبرمج و عرقلة دورتها. أظهر EAELN أعلى نشاط مضاد للتكاثر والاستماتة ضد السلالات المختبرة. تمارس كسور لـ BELN VLC (F1 و F6) الأكثر نشاطاً نشاطاً مضاداً للسرطان عن طريق تثبيط تكاثر الخلايا وتحفيز موت الخلايا المبرمج. تشخيص LC-HRMS/MS للمستخلصات والكسور عن وجود مركبات معروفة قد تكون مسؤولة عن أنشطة مضادة للأكسدة و للسرطان التي تمت ملاحظتها.

يمكن استخدام EAELN و F1 و F6 كمصدر ممتاز للمواد الكيميائية النباتية المضادة للأكسدة والمضادة للسرطان.

الكلمات المفتوحة: *L. numidicum* Murb؛ *Linum trigynum* L، النشاط المضاد للأكسدة؛ النشاط المضاد للكولين استراز ، النشاط المضاد للسرطان ، تحديد المركبات الكيميائية النباتية

Intitulé

Profils phytochimiques LC-HRMS/MS et évaluation des activités antioxydante, anticholinestérase et anticancéreuse d'extraits et de fractions VLC de deux espèces du genre *Linum* (Linaceae)

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat

RESUME

Dans cette étude, l'extrait acétate d'éthyle de deux espèces de *Linum*, *L. numidicum* Murb. (EAELN) et *L. trigynum* L. (EAELT) et les fractions de chromatographie liquide sous vide (VLC) de l'extrait *n*-BuOH de *L. numidicum* Murb. (BELN) ont été examinés, pour la première fois, pour leur capacité antioxydante, anticholinestérase et anticancéreuse. La composition en métabolites secondaires a été analysée par LC-HRMS/MS.

Les effets antioxydants de l'EAELN et l'EAELT ont été évalués *in vitro* par plusieurs méthodes complémentaires (DPPH, ABTS, CUPRAC, phénanthroline, et piégeage des radicaux galvinoxyles). L'activité anticholinestérase a été déterminée par la mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE). L'effet antiprolifératif de l'EAELN, l'EAELT et des fractions VLC contre les lignées PC3 et MDA-MB-231 a été évalué par le test MTT. L'apoptose des cellules PC3 a été détectée par coloration Annexine V-FITC/ IP, le cycle cellulaire a été déterminé à l'aide d'un kit de détection (IP/ RNase) et le contenu en ADN des cellules a été quantifié à l'aide d'un cytomètre en flux.

Les résultats de l'activité antioxydante ont montré pour la première fois que l'EAELN et l'EAELT exercent une activité antioxydante. L'EAELN a montré une meilleure activité par rapport à l'EAELT, cela pourrait s'expliquer par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes qui ont été identifiés par LC-HRMS/MS. Cependant ; l'EAELN et l'EAELT ont présenté une faible activité anticholinestérase par rapport au standard galantamine. L'EAELN et l'EAELT exercent une activité anticancéreuse en induisant l'apoptose et en bloquant le cycle cellulaire. L'EAELN a manifesté les activités antiproliférative et apoptotique les plus élevées contre les lignées testées. Les fractions VLC les plus actives (F1 et F6) de l'EBLN exercent une activité anticancéreuse en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose. Le profil LC-HRMS/MS des extraits a révélé la présence de composés connus qui pourraient être responsables des activités antioxydante et anticancéreuse observées.

L'EAELN, F1 et F6 peuvent être utilisés comme une excellente source de substances phytochimiques antioxydantes et anti-cancéreuses.

Mots clés : *L. numidicum* Murb. ; *Linum trigynum* L. ; activité antioxydante ; activité anticholinestérase ; activité anticancéreuse ; profil phytochimique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Campus Chasbet Ersas, 25000 Constantine, Algérie ; Laboratoire Radiopharmaceutique Bioclinique (LRB) Université Grenoble Alpes, France