



AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz –Fès – annonce que

M^{me} : AMRATI Fatima Ez-Zahra

Soutiendra : Vendredi 9 Décembre 2022 à 15h

Lieu : FSDM – Centre Visioconférence.

Une thèse intitulée :

Etude ethnopharmacologique, caractérisation phytochimique et évaluation de l'activité anti-cancéreuse de Caralluma europaea (Guss.) et certaines propriétés biologiques in vivo sous-jacentes.

En vue d'obtenir le Doctorat

FD : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies(MBSB)

Spécialité : Physiologie Pharmacologie et Santé Environnementale

Devant le jury composé comme suit :

Nom et prénom	Etablissement	Grade	Qualité
Pr. HichamBekkari	Faculté des sciences Dhar El Mehraz de Fès	PES	Président
Pr. TouriaZair	Faculté des Sciences, Université MoulayIsmaïl-Meknès	PES	Rapporteur & examinateur
Pr. Hassan Ghazal	Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique – Rabat	PH	Rapporteur & examinateur
Pr. Tarik Sqalli Houssaini	Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès	PES	Rapporteur & examinateur
Pr. MouadEdderkaoui	Université de Californie Los Angeles (UCLA)	PH	Examinateur
Pr. Amina bari	Faculté des sciences Dhar El Mehraz de Fès	PES	Examinateur
Pr. Abdenbi El karkouri	Faculté des sciences Dhar El Mehraz de Fès	PH	Examinateur
Dr. Nabil Boucetta	Laboratoire d'analyses SAISS, Fès	Pharmacien en Biologiste	Invité
Pr. DalilaBousta	Faculté des sciences Dhar El Mehraz de Fès	PES	Directeur de thèse



Résumé :

Depuis longtemps, la médecine traditionnelle a joué un rôle central dans la vie quotidienne de l'homme. Ce type de savoir médicinal traditionnel a été régulièrement pratiqué par de nombreux marocains dans le traitement de diverses maladies, dont le cancer. Ce travail de thèse a pour objectif d'évaluer les propriétés anticancéreuses de l'extrait total, des polyphénols, des flavonoïdes et des saponines de *Caralluma europaea* (Guss.), ainsi que leurs activités sous-jacentes à l'activité anticancéreuse telles que : l'activité anti-inflammatoire, analgésique, cicatrisante, et hépatoprotectrice. Le choix de la plante de *Caralluma europaea* est fondé essentiellement sur les résultats de notre enquête ethnopharmacologique menée dans la région de Fès-Meknès, Maroc. L'analyse phytochimique de *Caralluma europaea* a été réalisée par HPLC, UHPLC, GC-MS et microTOF. Le pouvoir antioxydant a été déterminé en utilisant le test DPPH, FRAP et TAC. Les extraits de *Caralluma europaea* ont été évalués pour leur pouvoir antiprolifératif contre les lignées cellulaires cancéreuses du sein en utilisant le test WST-1, et contre des lignées cellulaires du cancer pancréatique pour leurs pouvoirs cytotoxique et anti-apoptotique, seuls et en association avec la gemcitabine en utilisant le test MTT, et le test ELISA de fragmentation de l'ADN. L'expression des protéines et la quantification de l'ARNm des cellules souches cancéreuses (marqueurs de la résistance au traitement) ont été déterminées par Western Blot et RT-PCR. Ensuite, la toxicité aiguë de l'extrait hydroéthanolique à la dose 100, 300, 2000, et 5000 mg/kg, et la toxicité subaiguë de l'extrait hydroéthanolique, des polyphénols, des flavonoïdes et des saponines aux doses de 100, 50, 15 et 10 mg/kg respectivement ont été étudiées. Puis, nous avons mis l'accent sur des modèles *in vivo* de l'inflammation, l'analgésie, la cicatrisation et l'hépatotoxicité des extraits de *Caralluma europaea* sur des rats Wistar et des souris Swiss albinos. L'analyse chimique des différents extraits a révélé la présence des flavonoïdes (quercétine, lutéoline, kaempférol...), des acides phénoliques (acide férulique, acide gallique, acide caféique...), des sucres (talose, mannose, glucose...) et des acides gras (acide myristique, acide palmitique, vitamine D3...). La quantité des polyphénols totaux et des flavonoïdes est de 51,42 mg EGA/g d'extrait, et 20,06 mg EQ/g d'extrait respectivement. L'activité antioxydante la plus importante a été observée pour la fraction polyphénolique ($IC_{50}=0.035$ mg/ml). Quant aux lignées cellulaires du cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231, les saponines ont clairement montré une activité antiproliférative significative sur les deux lignées cellulaires, avec des valeurs IC_{50} de 5,097 μ g/ml et 4,195 μ g/ml respectivement. Le traitement des lignées cellulaires du cancer pancréatique avec les extraits de *Caralluma europaea* en association avec la gemcitabine a montré un effet antiprolifératif additif comparé à la gemcitabine seule. La plupart des extraits de *Caralluma*



europaea régulent à la baisse l'expression des cellules souches cancéreuses pancréatiques. L'extrait flavonoïdique semble avoir l'effet le plus intéressant sur les deux lignées cellulaires pancréatiques. Au cours du test de la toxicité aiguë et subaiguë, la DL_{50} de l'extrait hydroéthanolique de *Caralluma europaea* a été supérieure à 5000 mg/kg, et l'administration orale de la fraction saponosidique à la dose de 10 mg/kg a montré une certaine toxicité hépatique. L'extrait des saponines a montré le meilleur pourcentage d'inhibition d'œdème inflammatoire à la 6^{ème} heure de 78.75 %. Tous les extraits de *Caralluma europaea*, ont présenté un effet antinociceptif significatif au niveau périphérique et central. L'extrait polyphénolique semble avoir un effet à la fois hépatoprotecteur et cicatrisant.

Les extraits de *Caralluma europaea* ont montré des activités cytotoxiques très intéressantes sur le cancer du sein et du pancréas *in vitro*, ainsi que sur plusieurs pathologies qui sont en relation directe ou indirecte avec le développement du cancer. En perspectives, il serait intéressant d'évaluer l'effet de nos extraits et leurs molécules majoritaires notamment le kaempférol, et la lutéoline sur des modèles *in vivo* de cancer du sein et pancréas.

Mots clés : *Caralluma europaea* (Guss.); Polyphénols ; Flavonoïdes ; Saponines, Toxicité ; Inflammation ; Douleur ; Cicatrisation ; Cancer pancréatique, Cancer du sein.



Abstract :

Traditional medicine has played a central role in daily human life for a long time. Many Moroccans have regularly practiced this type of traditional medicinal knowledge to treat various diseases, including cancer. This thesis work aims to evaluate the anticancer properties of *Caralluma europaea* (Guss.), total extract, polyphenols, flavonoids, and saponins, as well as their activities underlying the anticancer activity, such as anti-inflammatory, analgesic, hepatoprotective, and wound healing activities.

The choice of the plant "*Caralluma europaea*" was based on the results of our ethnopharmacological survey in Fez Meknes region, Morocco. The chemical composition was analyzed using HPLC, UHPLC, GC-MS, and microTOF. The antioxidant power was determined using DPPH, FRAP, and TAC assays. The antiproliferative potential of *Caralluma europaea* was evaluated against breast cancer cell lines using WST-1, and the cytotoxic effect with and without gemcitabine, on pancreatic cancer cell survival and apoptosis was determined by MTT assay and DNA fragmentation ELISA, respectively. The protein expression was detected by Western blot, where the expression level and quantification of mRNA of cancer stemness markers were measured using Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The acute toxicity was performed by single oral administration of 100 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg, and 5000 mg/kg of hydroethanolic extract. The subacute toxicity of hydroethanolic, polyphenols, flavonoids, and saponins extracts was investigated at 100 mg/kg, 50 mg/kg, 15 mg/kg, and 10 mg/kg, respectively. Then, we focused on *in vivo* inflammation, analgesia, hepatotoxicity, and wound healing models in Wistar rats and Swiss albino mice.

The chemical analysis revealed the presence of flavonoids (quercetin, luteolin, kaempferol, etc...), phenolic acids (ferulic acid, gallic acid, caffeic acid, etc.), sugars (talose, mannose, glucose, etc.), and fatty acids (myristic acid, palmitic acid, vitamin D3, etc.). The polyphenol and flavonoid contents were estimated at 51.42 mg EGA/g and 20.06 mg EQ/g, respectively. The most significant antioxidant activity was observed for the polyphenolic fraction ($IC_{50}=0.035$ mg/ml). Saponins exhibited significant antiproliferative activity on both breast cancer cell lines of MCF7 and MDA-MB-231, with IC_{50} values of 5.097 μ g/ml and 4.195 μ g/ml, respectively. Cells treated with *Caralluma europaea* extracts combined with gemcitabine revealed an additive anti-survival activity. *Caralluma europaea* extracts sensitized resistant MIA PaCa-2 to gemcitabine treatment. Most of the *Caralluma europaea* extracts downregulated the expression of cancer stemness-associated genes. The flavonoid extract seems to have the most interesting effect on the two pancreatic cell lines. The acute toxicity test showed hydroethanolic extract's median lethal dose was over 5000 mg/kg. Only saponins extract showed some hepatic toxicity signs during the subacute toxicity test. Saponins extract was the best inhibitor of



edema by 78.75 % after 6 h of treatment. All *Caralluma europaea* extracts presented a significant antinociceptive effect peripherally and centrally. The polyphenols extract showed the most significant wound contractions effect on the 21st day (100±0.00 %), and presented a promising source of hepatoprotective agents against toxic liver injury. The extracts of *Caralluma europaea* have shown exciting cytotoxic activities on breast and pancreatic cancer *in vitro* and on several pathologies directly or indirectly related to cancer development. So, it would be interesting to evaluate the effect of our extracts and their main molecules, in particular kaempferol and luteolin, on breast and pancreatic cancer *in vivo* models.

Key Words :

Caralluma europaea (Guss.); Polyphenols; Flavonoids; Saponins, Toxicity; Inflammation; Pain; Wound healing; Pancreatic Cancer, Breast Cancer.