

République Algérienne Démocratique Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDE RAHMANE MIRA – Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Génétique Appliquée

Thème

Evaluation de l'activité génotoxique
et antigénotoxique de l'extrait éthanolique de l'écorce
de *Ulmus campestris*

Réalisé par :

- HADJOUT Nesrine
- HADJOUT Nabil

Membre de jury :

Président : M^{me} Debbach.N

Promotrice : M^{me} OUAHMED H

Examinatrice : M^{elle} TAHIRI W

Examinatrice : M^{elle} Cherrafat.N

Grade et lieu :

M.A.A. (U.A.M.B.)

M.A.A. (U.A.M.B.)

M.A.A. (U.A.M.B.)

M.A.A. (U.A.M.B.)

ANNÉE 2013/2014

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le bon dieu "Allah", le tout Puissant.

*Nous remercions chaleureusement notre promotrice **Mme Ouahmed.H** pour sa disponibilité, son aide précieuse, sa patience, sa confiance placée en nous et surtout sa gentillesse. Aujourd'hui nous vous exprimons Madame toute notre reconnaissance.*

*Nous remercions **Mr ATMANI** et **Mme ATMANI** de nous avoir ouvert les portes du laboratoire pour la réalisation de notre travail*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer notre travail : **Mme Debbach** pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir accepté de présider le jury.*

***Melle Cherraf. N**, **Melle TAHIRI.W**. Pour l'honneur qu'elles nous on fait d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

*Nous remercions **Mr Moussli** pour son aide précieuse et sa disponibilité.*

*Nous remercions aussi **Ghania** pour sa disponibilité et ses encouragements toute au long de notre travail*

*Sans oublier les membres du laboratoire: **Melle AYOUNI**, **Mme BERBOUCHA**, les ingénieures du laboratoire génétique, et tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.*

Et que ces lignes soient le témoignage de notre sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Nabil et Nesrine

Dédicaces

*À nos chers parents qui ont toujours été là pour nous motiver à
donner le meilleur de nous-mêmes et de ne jamais baisser les bras
et d'être toujours présent*

On ne vous remerciera jamais assez

À notre adorable petit frère cherif

À notre oncle Slimane et sa femme

À notre oncle Omar et sa femme

À tout nos amis

Et À toute la famille

Nabil et Nesrine

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CTP	Cytidine triphosphate
CaSo4	Sulfate de calcium
C2H4O2	Acide acétique
DMSO	Di-Méthyl Sulfate Oxyde
GTP	Guanine triphosphate
G0	Gap0
G1	Gap1
G2	Gap2
HCL	Chlorure d'hydrogène
IM	Indice mitotique
KCL	Chlorure de sodium
MgSo4	Sulfate de magnésium
NaHCo3	Bicarbonate de sodium
NF-IL6	Nuclear factor interleukine 6
ORC	Origin recognition complex
S	Synthèse
TTP	Tyrosine triphosphate
UV	Ultra violet

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
Tableau I	Types des agents mutagènes	9
Tableau II	classification de <i>Allium cepa</i>	24
Tableau III	Classification de <i>Ulmus campestris</i>	24
Tableau IV	Pourcentage des aberrations chromosomiques observées dans les cellules d' <i>alliumcepa</i>	35

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	page
Figure 1	le cycle cellulaire	2
Figure 2	Les phases du cycle cellulaire	3
Figure 3	les étapes de la mitose	4
Figure 4	intervention des cycline/CDK au niveau du cycle cellulaire	5
Figure 5	Régulation de la transition G2/M et de l'activité de CDK1/cycline B	5
Figure 6	Classification de changement moléculaire dans l'ADN provoquant une mutation	6
Figure 7	mutation non sens	7
Figure 8	Action du stress oxydatif sur l'ADN	10
Figure 9	La phase d'initiation de la peroxydation lipidique	11
Figure 10	La phase de propagation de la peroxydation lipidique	11
Figure 11	les étapes de peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire	12
Figure 12	Modification des protéines par voie oxydative	13
Figure 13	Les dommages induits par le stress oxydant sur l'ADN, lipides et protéines	13
Figure 14	Les mécanismes de réponse antimutagenique de la cellule	14
Figure 15	mécanisme de réparation d'ADN par excision	15
Figure 16	Mécanisme de réparation des mésappariement	16
Figure 17	modification de la transduction du signal par les polyphenols	18
Figure 18	effet des polyphenols dans les cellules cancéreuses	18
Figure 19	schéma générale du protocole du teste de come	20
Figure 20	le protocole du teste d'Ames	21
Figure 21	a) <i>Ulmus campestris</i> b) écorce de <i>Ulmus campestris</i>	25
Figure 22	a) bulbe divisée en quatre b) les bulbes incubés dans une étuve à 25°C	26
Figure 23	bulbes pour l'évaluation de l'activité anti-génotoxique	27
Figure 24	les racines dans la solution fixatrice	28
Figure 25	a) racines non traitées b) racines traitées avec <i>U.campestris</i> c) racines traitées avec l'azide de sodium	30
Figure 26	effet de l'extrait <i>U. campestris</i> sur le taux de croissance des racines d' <i>Allium cepa</i>	31
Figure 27	effet d' <i>U.campestris</i> sur le taux de croissance en présence de l'azide de sodium	32
Figure 28	effet de l'extrait d' <i>Ulmus campestris</i> sur l'indice mitotique	34
Figure 29	les différentes observations des cellules d' <i>allium cepa</i> qui ont subit le traitement avec l'azide de sodium à 25 µg / ml	36
Figure 30	les différentes observations des cellules d' <i>allium cepa</i> qui ont subit le traitement avec l'azide de sodium à 100µg/ml	37
Figure 31	les différentes observations des cellules d' <i>allium cepa</i> qui ont subit les testes d'activité génotoxique	38
Figure 32	l'effet d' <i>Ulmus campestris</i> sur l'indice mitotique en présence de l'azide de sodium	39
Figure 33	effet d' <i>Ulmus campestris</i> sur le pourcentage d'aberration	40
Figure 34	: A : observation des racines traitées avec l'azide de sodium à 100µg/ml B : observation des racines traitées avec l'azide de sodium et <i>ulmus campestris</i> à 100µg/ml	40

Sommaire

Introduction	page 1
Partie synthèse bibliographique.	
I-Le cycle cellulaire.....	page2
I-1Les phases du cycle cellulaire.....	page2
I-2Régulation du cycle cellulaire.....	page5
II-Mutagenèse et génotoxicité	page6
II-1 Types de mutations.....	page7
II-1-1Les mutations ponctuelles.....	page7
II-1-2Mutations de grande ampleur.....	page8
II-2 Agents mutagènes.....	page8
III-2-1Les Radicaux libres et le stress oxydant.....	page9
II-2-1-1 Action du stress oxydatif sur l'ADN.....	page10
II-2-1-2 Action du stress oxydatif sur les lipides.....	page11
II-2-1-3 Action du stress sur les protéines	page12
III-Mécanismes d'anti-mutagenicité.....	page14
III-1 Mécanismes de Réparations.....	page14
III-1-1 Réparation par excision	page14
III-1-2Réparation par réversion	page15
III-1-3 Réparation des mésappariements.....	page16
III-2 Mécanismes antioxydants.....	page17
III-3 Induction de l'apoptose	page18
III-4 Détoxification et dégradation.....	page19
IV-Méthodes d'étude de l'activité mutagénique et antimutagénique	page20
IV-1 Test de comet.....	page20
IV- 2 Test d'Ames.....	page21
IV-3 Teste <i>Allium cepa</i>	page22
IV-4 Avantages et limites des méthodes d'étude de la génotoxicité <i>in vitro</i>	page22
Partie matériel et méthodes	
II. Matériel et méthodes	page23
II.1.Matériel	page23
II.1.1.Produits chimiques	page23

II.1.2. Autre matériel	page23
II.1.3.Matériel végétal	..page23
II.2 Méthodes.....	page26
II.2.1 Préparation des échantillons	page26
V-1 Evaluation macroscopique	page27
V-2 Etude cytologique	page28
V-3 Analyse statistique... ..	page29
Résultats et discussion.	
VI-Evaluation macroscopique... ..	page30
VI-1 Evaluation morphologiques	page30
VI-1-2 la croissance des racines.....	page30
VI-2 Activité cytotoxique	page33
VI-3-Activité anti-génotoxique	...page39
VII-Discussion.....	page41
Conclusion.....	page46
References bibliographiques	page47

INTRODUCTION

Introduction

La phytothérapie est le traitement curatif ou préventif des maladies et des troubles subjectifs obtenus à partir de plantes entière ou d'organes de plantes (feuilles, fleurs, racines, fruits, graines) (V.Fintelmann et al ., 2004) .

Partout dans le monde l'intérêt pour la médecine traditionnelle s'accroît constamment, l'utilisation des plantes est très ancienne, et pendant très longtemps elle a représenté pratiquement le seul moyen de soigner, basé sur l'empirisme.

Il est connu que les plantes sont une source d'antimutagènes, en dépit de leurs avantages, plusieurs études ont rapporté la toxicité et mutagénicité de certains de leurs constituants (Kwan et al.,2012).

L'utilisation de certaines plantes est reliée à la formation de tumeurs chez certaines populations (Tulay et al.,2010), par conséquent plusieurs études se sont intéressées à l'évaluation de l'activité génotoxique et antigénotoxique des extraits de plantes (Khakdan et al.,2012).

Les plantes supérieures sont très utilisées pour l'évaluation de l'activité cytotoxique, génotoxique et antigénotoxique. (Sarhanet al .,2010).

Dans notre étude on a opté pour le modèle *Allium cepa* suite à la facilité de sa réalisation.

Le but de notre étude est l'évaluation de l'activité génotoxique et antigénotoxique de l'extrait éthanolique d'écorce de *Ulmus campestris*, et de savoir si ces activités sont dépendantes ou indépendantes du temps d'incubation.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

I-Le cycle cellulaire

La reproduction cellulaire dépend de la transmission de l'information génétique, et cette dernière dépend des étapes du cycle cellulaire qui sont impliquées dans la réplication et la ségrégation des chromosomes (Andrew et al. 1995) ; le cycle cellulaire c'est la division d'une cellule mère en deux cellules filles (figure 1) (Marc., 2002).

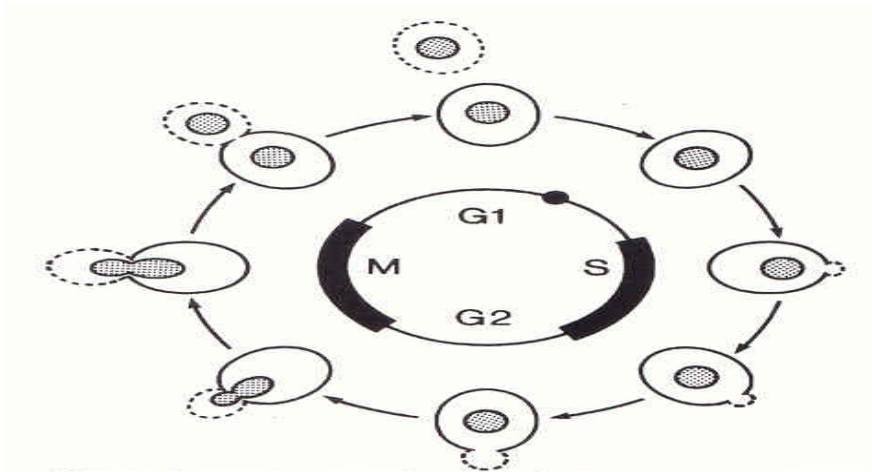


Figure 1 : le cycle cellulaire (Marc., 2002).

I-1 Les phases du cycle cellulaire

Les phases du cycle cellulaire sont définies comme des événements chromosomiques, l'ADN de la cellule est répliqué par l'ADN polymérase (Pagan., 1998) qui utilise un brin d'ADN pour synthétiser le brin complémentaire par l'addition de nucléotides fournis par le précurseur d'ATP, TTP, GTP et CTP. (Lacave et al, 2005), ces événements se produisent lors de la phase S du cycle cellulaire, la deuxième phase la plus importante est la phase M ou mitose elle-même subdivisée en 4 phases (figure 2) : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Irniger, 2002) durant ces 4 phases deux événements très importants se produisent : la division du noyau (mitose) et la division de la cellule (cytokinèse) (Morga., 2007).

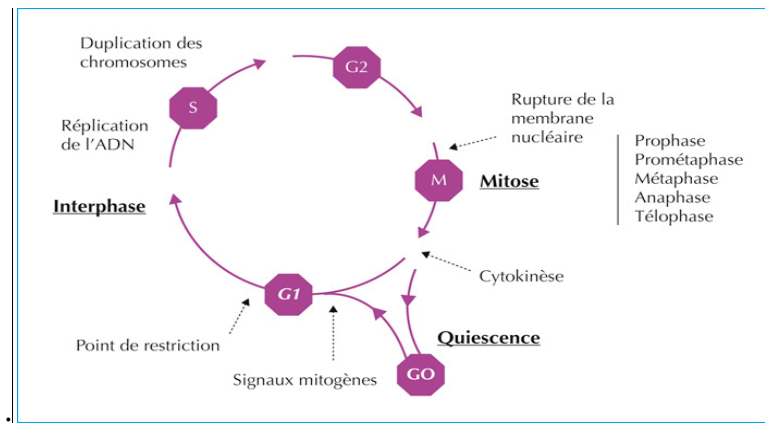


Figure 2 : Les phases du cycle cellulaire (Irniger., 2002).

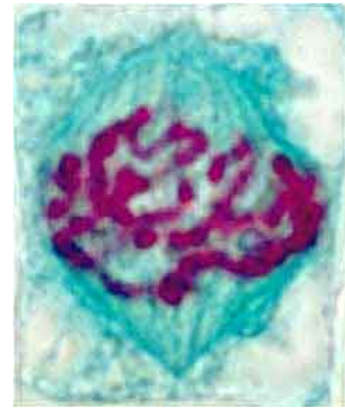
Le cycle cellulaire contient des phases additionnelles (figure 2) connues sous le nom de gap entre la phase S et la phase M, la première est la phase G1 qui se déroule avant la phase S (Gary.,2004) c'est la phase la plus longue du cycle cellulaire, en conditions défavorables à la croissance, le cycle cellulaire peut être arrêté et les cellules entrent en phase G0 (Grunwald et al, 2010), la deuxième phase est G2, elle se déroule avant la phase M (Gary.,2004). Les phases gap procurent à la cellule le temps suffisant pour sa croissance, elles permettent la régulation de la progression du cycle cellulaire (Morgane.,2007). Toutes ces phases contribuent au contrôle et à la synthèse de composés indispensables (protéine, ADN...) au bon déroulement de la mitose. La mitose est la phase finale de la division cellulaire elle est subdivisée en 4 phases qui doivent impérativement être bien régulées afin d'éviter des anomalies cellulaires. Les différentes phases et leurs caractéristiques sont résumées comme suit :



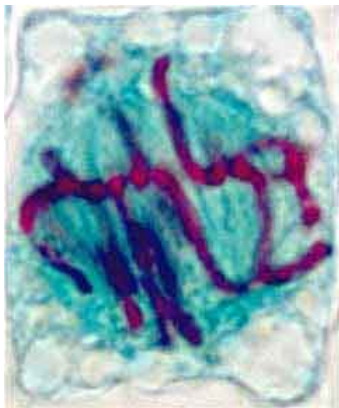
L'interphase : les chromosomes ne sont pas individualisés. Les nucléoles sont présents. Le noyau est entouré de l'enveloppe nucléaire.



La prophase : les chromosomes s'individualisent, ils sont constitués de deux chromatides réunies par leur centromère. Les nucléoles et la membrane nucléaire disparaissent.



La prometaphase : un fuseau constitué de microtubules est formé. Les chromosomes individualisés sont groupés à l'intérieur de ce fuseau.



La métaphase : les chromosomes se regroupent progressivement à l'équateur du fuseau. Ils y restent jusqu'à ce que tous soient bien placés.



La métaphase : sur cette photographie, on constate que les chromosomes regroupés en plaque métaphasique sont bien constitués de deux chromatides.



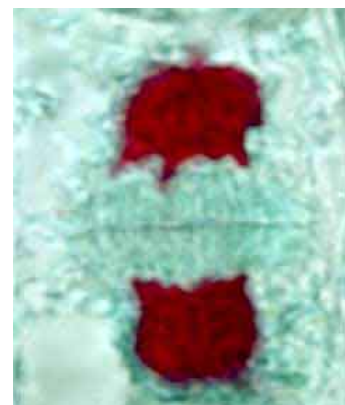
L'anaphase (début) : les deux chromatides de chaque chromosome se séparent. Tous les chromosomes réagissent en même temps.



L'anaphase (suite) : les deux chromatides de chaque chromosome sont séparées. Les deux lots de chromosomes fils montent vers les pôles.



La télophase (début) : les chromosomes se regroupent aux pôles. La nouvelle paroi cellulaire se forme à partir du centre (phragmoplaste).



La télophase : les chromosomes perdent leur individualité et reconstituent deux noyaux. La nouvelle paroi cellulaire va séparer complètement les deux cellules filles.

Figure 3 : les étapes de la mitose (Gary .,2004).

I-2Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est contrôlé par des cyclines dépendantes de protéines kinase (Figure 4), la plupart des gènes de cyclines sont hautement exprimés dans les régions prolifératives des plantes plus spécifiquement le méristème (Carter ., 2005).

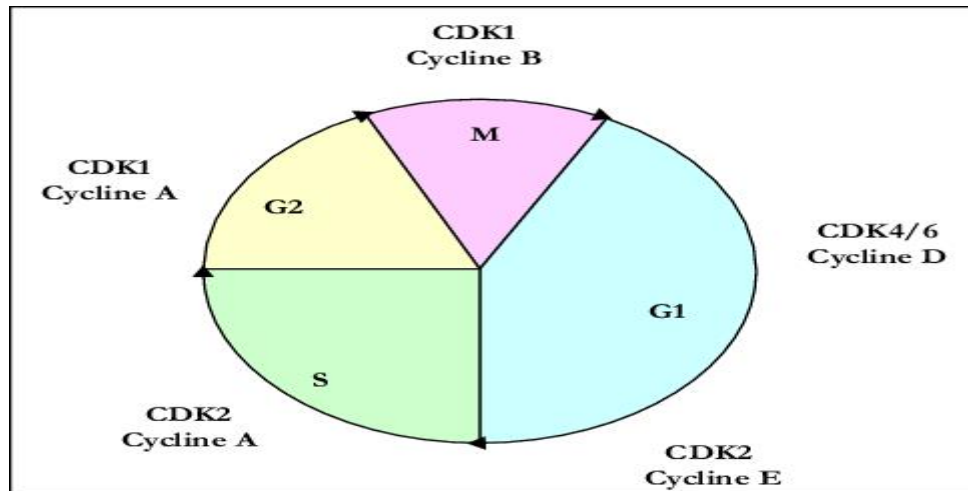


Figure 4 : intervention des cycline/CDK au niveau du cycle cellulaire (Carter ., 2005).

- Les étapes du cycle cellulaire sont initiées par trois check points :

Le premier est appelé START ou G1/S, il est contrôlé par un complexe protéique de six unités ORC ce dernier recrute deux facteurs Cdc6 (ATPase) et Cdt 1 qui vont permettre le recrutement des protéines MCM (Carter .T ., 2005) .

Le deuxième est G2/M (figure 5), durant la phase G2 la kinase CDK1/cycline A est active (Lacave. R et al, 2005), mais durant la transition G2/M le complexe CDK1/cycline B est inactif et cytoplasmique (Irniger.,2002).

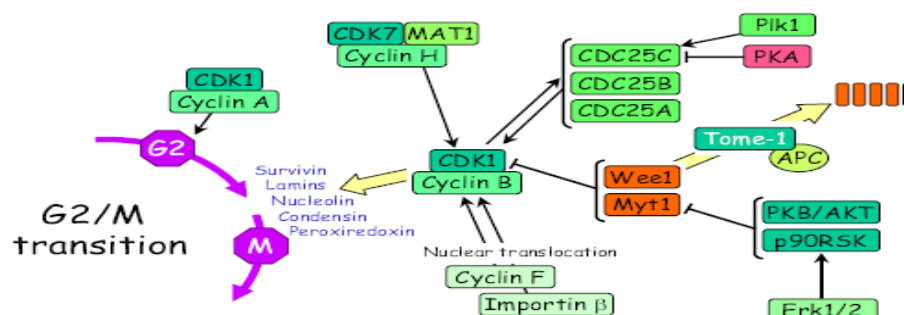


Figure 5 : Régulation de la transition G2/M et de l'activité de CDK1/cyclineB (Lacaveet al ., 2005)

Le troisième est la transition métaphase /anaphase, la progression de cette transition se fait à travers l'activité du complexe cycline B/CDK qui stimule l'activation d'une enzyme appelée anaphase promoting complexe (APC) qui engendre la destruction des cyclines et des protéines qui permettent la liaison des deux chromatides, donc séparation et ségrégation des deux chromatides (Morgan.,2007).

D'autres protéines interviennent pour réguler la progression, si la régulation est positive elles sont dites oncogènes comme la P21, P27, au cas contraire elles sont dites anti-oncogènes tel est le cas de PRB, P107 et P130 (Lacave et al., 2005).

II-Mutagenèse et génotoxicité

La génotoxicité peut se manifester directement par son action sur le matériel génétique ou indirectement par l'intermédiaire des lésions des macromolécules biologiques provoquant des dysfonctionnements enzymatiques. La mutagenèse peut résulter de ces altérations et notamment des mutations qui peuvent émerger suite à des erreurs durant la réplication de l'ADN. Celles-ci sont très rares, ce sont des mutations spontanées. Le taux de mutation augmente lorsque les cellules sont exposées à des agents chimiques ou physiques appelés mutagènes qui interagissent directement avec l'ADN (Winter et al.,2006) et modifient la structure de certains nucléotides. Ceci peut conduire à une modification ou à une impossibilité d'appariement des bases de sorte que lorsque l'ADN est répliqué, une base incorrecte est insérée face à la base modifiée ce qui modifie la séquence d'ADN. Les cycles de réplication suivants rendent le changement permanent et laissent la séquence d'ADN mutée. Certains mutagènes agissent de façon différente et provoquent de sérieuses distorsions physiques de l'ADN qui bloquent sa réplication ou sa transcription (figure 7) (Brusick.,1987).

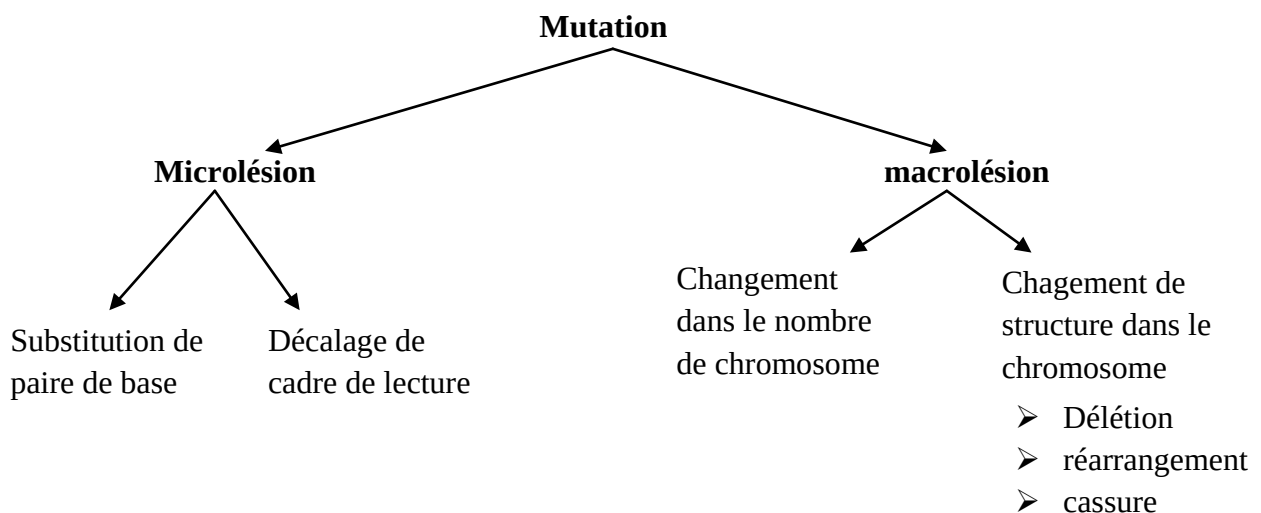


Figure 6 : Classification de changement moléculaire dans l'ADN provoquant une mutation (Brusick.,1987).

II-1 Types de mutations

Les trois types de génotoxicité les plus connus pour provoquer des complications pour la santé sont : mutations au niveau des gènes, aberrations chromosomiques et changements dans le nombre de chromosomes (Brusick.,1987).

Les mutations peuvent être divisées en 2 types : mutation ponctuelle et mutation de grande ampleur :

II-1-1 Les mutations ponctuelles

Se sont des mutations où une seule base est concernée, selon leurs conséquences sur la protéine codée par le gène muté elles sont divisées en plusieurs catégories.

***Mutations faux sens**

L'altération de la base modifie le codon de telle sorte que l'acide aminé soit aussi modifié, l'effet de cette mutation sur l'organisme est variable, cela dépend des régions modifiées des protéines, les régions qui sont importantes pour la structure et la fonction de la protéine sont plus susceptible d'avoir un effet létal (Jack et al ., 2003).

***Mutations non sens**

L'erreur se produit lors de la réplication de l'ADN se qui va provoquer un décalage du cadre de lecture, cette altération provoque le changement du codon d'acide aminé en un codon stop (figure 7), par conséquent la protéine traduite sera plus courte et perdra une partie de sa région c-terminale. Les mutations non sens ont un effet important sur l'activité de la protéine mutée (Claire., 2001).

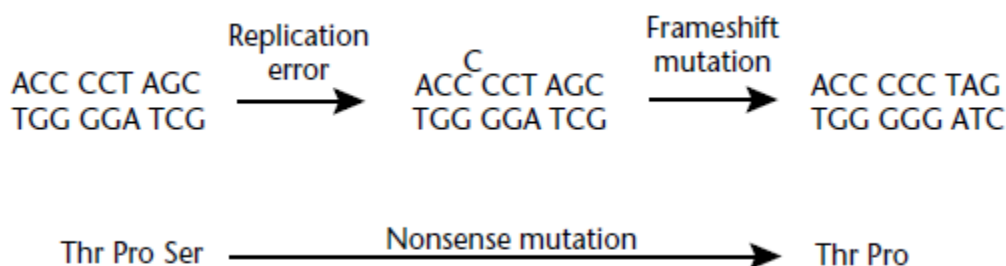


Figure 7 : mutation non sens (Claire., 2001).

***Mutations silencieuses**

Les mutations silencieuses n'ont pas d'effet sur la protéine codée et ne conduisent pas à un phénotype mutant, elles s'accumulent dans l'ADN des organismes sous forme de polymorphismes (Jack et al ., 2003).

II-1-2 Mutations de grande ampleur

Des séquences d'ADN de plus grande taille sont mises en jeux, provoquant des altérations au niveau de l'ADN impliquant la perte de longs éléments. Elles sont divisées en plusieurs catégories :

- Les délétions qui consistent en la perte d'une partie de séquence d'ADN qui peuvent être engendrées par des cassures.
- Les insertions qui sont des mutations qui résultent de l'insertion de base et qui engendre un décalage de cadre de lecture.
- Les Réarrangements comme les inversions et les translocations qui correspondent à des échanges mutuels entre segments d'ADN.

Parmi toutes ces mutations certaines peuvent être spontanées et d'autres induites, nous nous intéresserons aux mutations induites par des agents dis mutagènes.

II-2 Agents mutagènes

L'agent mutagène est un produit chimique ou physique qui induit des altérations de la structure ou du nombre de chromosomes des cellules .La nature de la lésion que provoque un agent mutagène est très importante pour l'évaluation de son potentiel (Brusick.,1987). Il existe plusieurs types d'agents mutagènes dont les plus importantes catégories sont résumées dans le tableau I.

Tableau I : types d'agents mutagènes (Léonard., 1990)

Agents mutagènes	Effet
Rayonnement UV	Les UV ont la propriété de produire des liens entre les brins opposés et aussi des liaisons entre l'ADN et les protéines connues sous le terme « cross-links »
Agents chimiques	Une grande variété de produits chimiques est en mesure de causer des mutations de l'ADN .Certains mutagènes chimiques sont des analogues de bases azotées d'autres modifient les bases, souvent par l'addition de groupements alkyles ou aryles ou par désamination
Radiation ionisante	Des radiations ionisantes sous forme de rayons X ou gamma endommagent l'ADN de façon extensive.

La plupart des mutagènes qu'ils soient chimiques ou environnementaux induisent leur toxicité principalement via l'augmentation de la production des EROs et donc du stress oxydant.

II-2-1 Les Radicaux libres et le stress oxydant

Les radicaux libres sont des agents mutagéniques, l'excès de production de radicaux libre *in vivo* par des sources endogènes ou exogènes, la cellule en état de stress oxydant ce qui peut avoir comme résultat des dommages des biomolécules, incluant l'ADN et les protéines et des lipides et donc des membranes cellulaires (Miral, 1991 ; sorg, 2004 ; Saharabway et al., 2006).

La génotoxicité de la plupart des produits chimiques incluant les métaux vient de leur capacité d'induire la production de variété de radicaux libres tels que H_2O_2 , O_2^- et OH^- qui interagissent avec l'ADN et provoquent des cassures et d'autres dommages à l'ADN (Saharabway et al., 2013).

II-2-1-1 Action du stress oxydatif sur l'ADN

L'ADN et ses acides nucléiques sont très sensibles aux attaques radicalaires (figure 8). Les lésions se résument en :

- Des dommages au niveau des bases d'ADN (apparition d'analogues de base)
- Des liaisons ADN-protéine (DPCs)
- Des dommages au niveau des oses
- Des coupures simples brin
- Des coupures doubles brin (Miral., 1991)

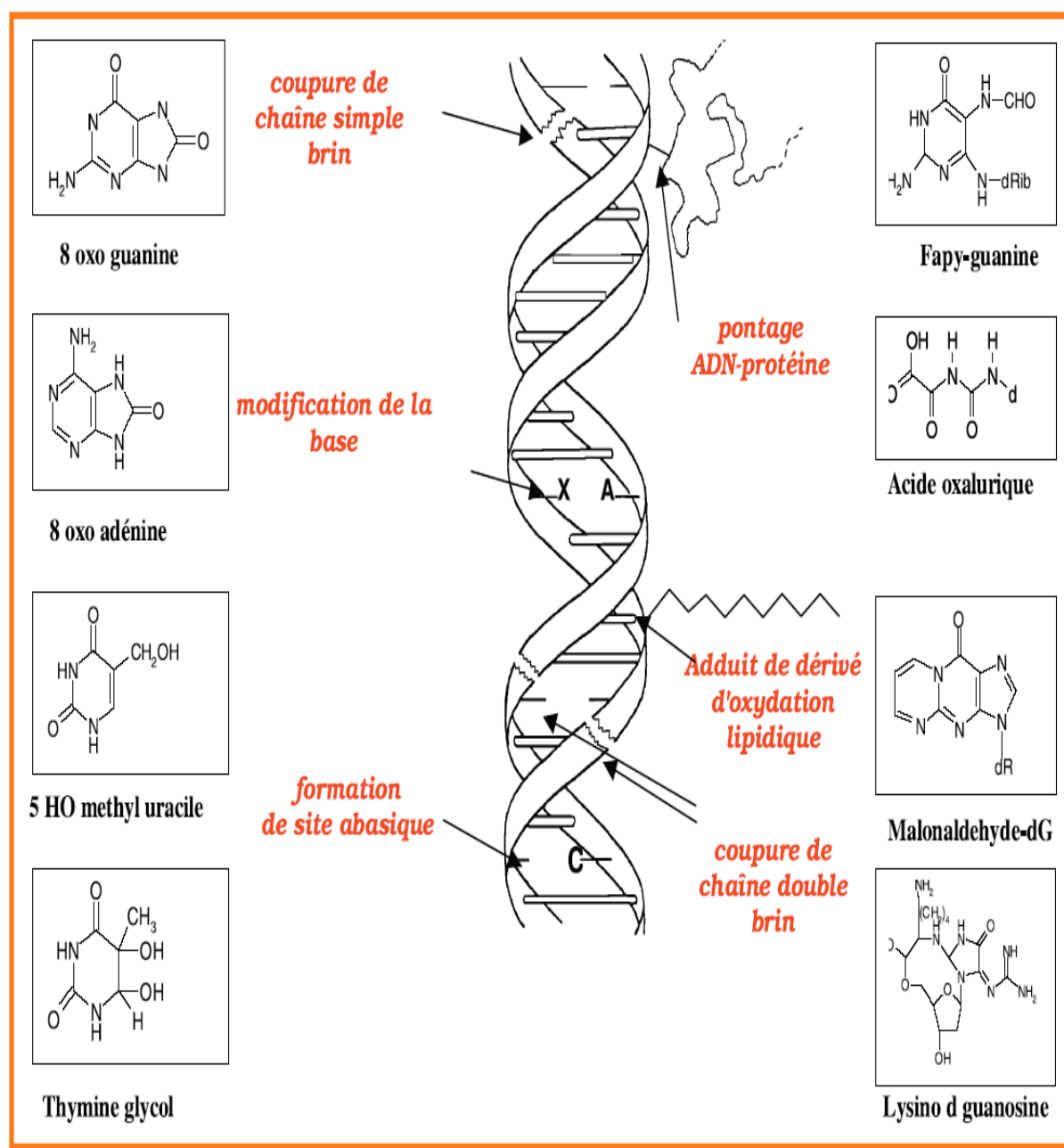


Figure 8 : Action du stress oxydatif sur l'ADN (Miral., 1991).

II-2-1-2 Action du stress oxydatif sur les lipides

Le stress oxydatif a un effet surtout sur les acides gras polyinsaturés et provoque une peroxydation de ces derniers et elle peut aussi se produire sur les acides gras composant la membrane cellulaire ce qui va provoquer la toxicité de la cellule (Randoux., 1997), le mécanisme peut être divisé en trois phases : initiation, propagation et terminaison. La phase d'initiation (figure 9) est caractérisée par l'activation d'O₂ et l'oxydation d'un radical.

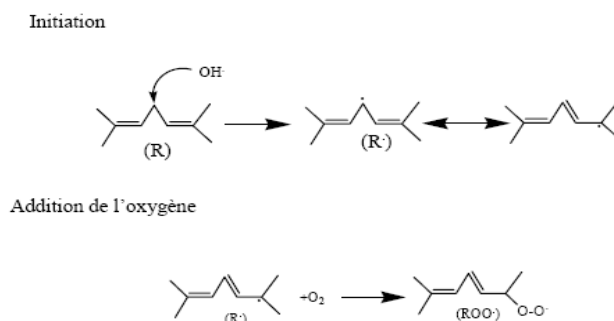


Figure 9 : La phase d'initiation de la peroxydation lipidique (Randoux., 1997)

les radicaux libres peuvent agir sur les lipides de la membrane cellulaire et former des lipides hydroperoxides et des radicaux peroxy, ces derniers sont très réactifs et capables de propager la réaction (figure 10). Les lipides hydroperoxides peuvent subir un clivage réducteur par les métaux réduits tels que Fe²⁺ (Marisa et al., 2012).

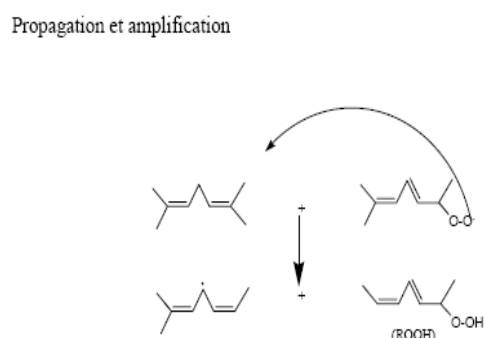


Figure 10: La phase de propagation de la peroxydation lipidique (Randoux., 1997).

Toutes les étapes de peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire sont représentées dans la figure 11.

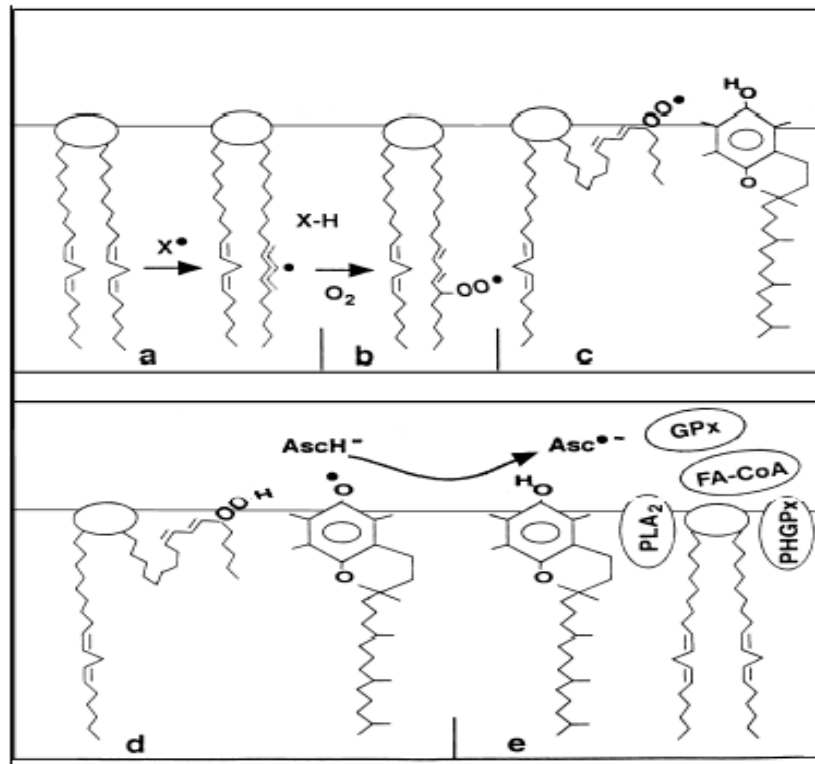


Figure 11 : les étapes de peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire (Marisa et al., 2012).

II-2-1-3 Action du stress sur les protéines :

Leur effet est surtout sur le thiol des cystéines et méthyle des protéines comportant des groupements sulfhydryles (méthionines) qui sont oxydées en sulfate ou en un intermédiaire radicalaire ce qui provoque un changement de conformation, de groupements (Randoux.,1997) et même à la formation de réticulation (Favier., 2003). Les protéines ainsi oxydées deviennent plus sensibles aux actions des protéases et perdent leur fonctionnalité (figure 12).

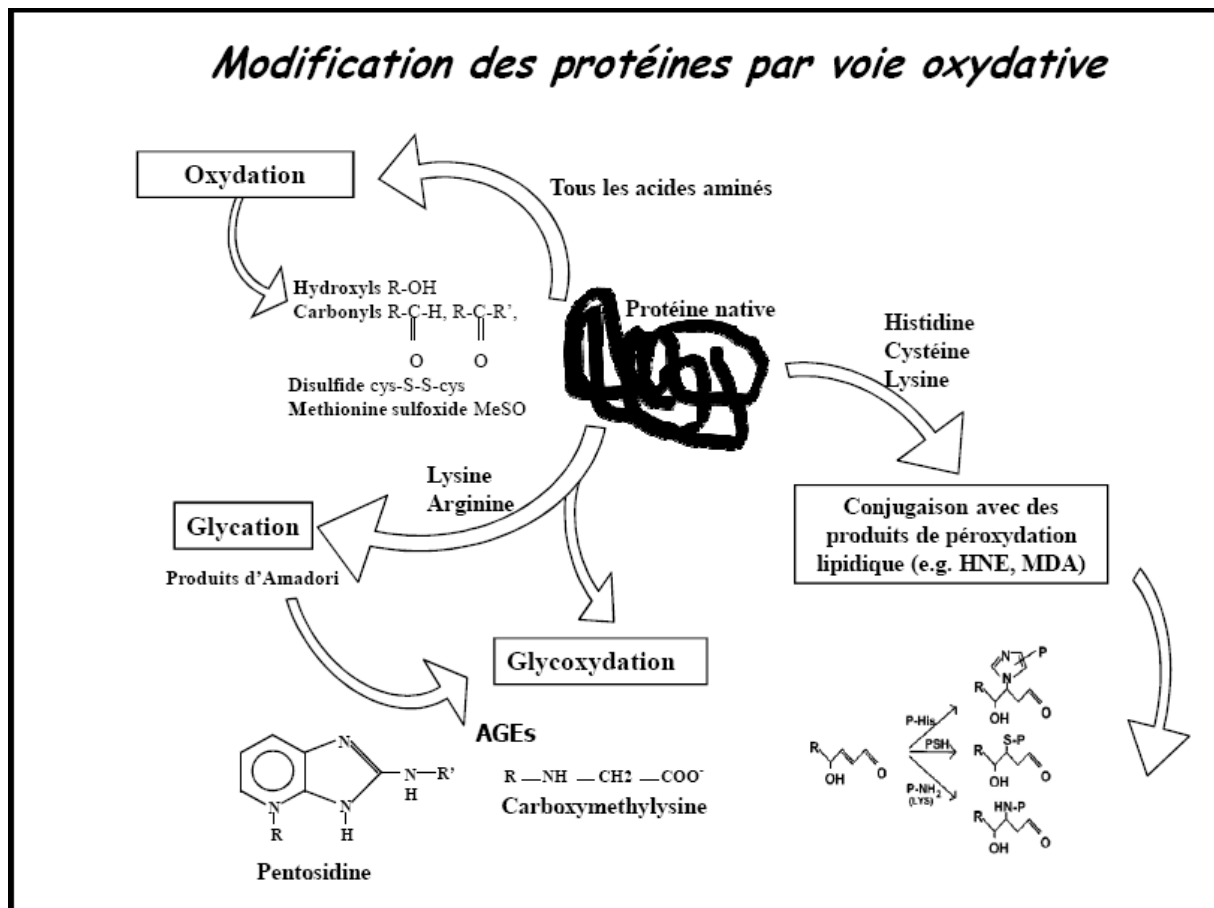


Figure 12 : Modification des protéines par voie oxydative (Randoux.,1997).

Comme il a été déjà cité le stress oxydant est capable d'induire des dommages au niveau des biomolécules, le schéma représenté dans la figure 13 résume tous ces dommages.

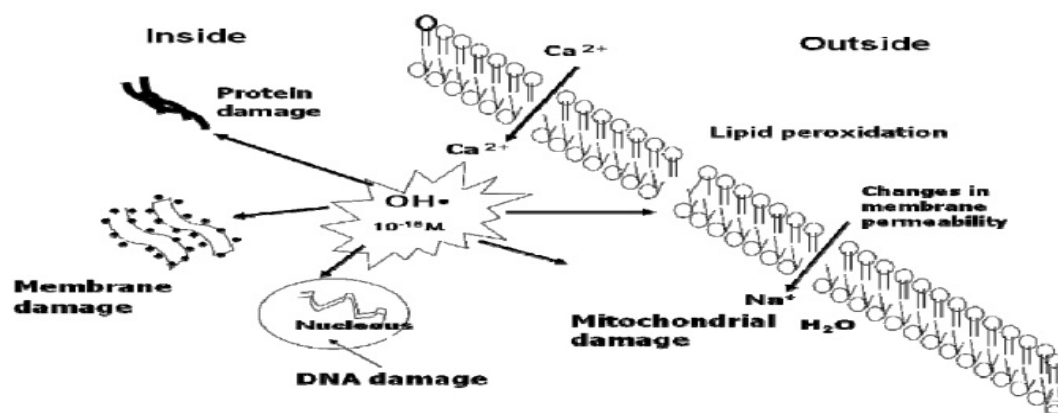


Figure 13: Les dommages induits par le stress oxydant sur l'ADN, lipides et protéines (Marisa et al., 2012)

III-Mécanismes d'anti-mutagenicité :

Un antimutagène est toute substance capable d'inhiber les propriétés mutagènes ou cancérogènes d'autres composés, ils peuvent être exogènes ou endogènes.

Les organismes développent des mécanismes permettant d'empêcher les mutations et ceci en réparant les dommages causés à l'ADN, en diminuant le stress oxydatif, en activant et l'apoptose et / ou induisant la dégradation des protéines inactives et la détoxification cellulaire (figure 14) (Evgeniya et al.,2008).

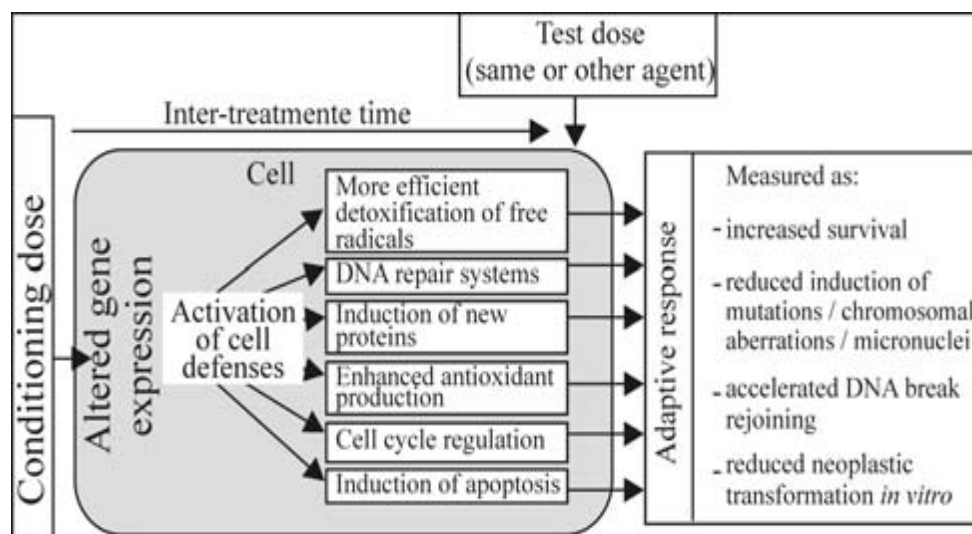


Figure 14 : Les mécanismes de réponse antimutagenique de la cellule

(Evgeniya et al.,2008).

III-1 Mécanismes de Réparations

Ces mécanismes de réparations sont complexes mais on distingue trois types principaux :

III-1-1 Réparation par excision

Il intervient dans le cas de dommages graves (dimères), une première enzyme reconnaît le dommage et incise le brin correspondant. Une exonucléase enlève la région endommagée, alors une ADN polymérase intervient et reconstitue la séquence en prenant pour matrice le brin complémentaire intact et enfin une ADN ligase intervient pour coller les extrémités (Clark., 2010). plusieurs protéines interviennent dans le mécanisme de ce système de réparation :

-La RPA intervient pendant la réplication pour stabiliser le monobrin, son interaction avec la protéine XPA permet d'augmenter l'affinité de cette dernière avec l'ADN simple brin.

- XPA va se lier avec le complexe XPC/Hhr23B qui va lui permettre de reconnaître la lésion.
- le facteur de transcription TFIIH qui est une protéine de 9 sous unités, XPD et XPB font partie des 9 sous unités.
- TFIIH va se lier au complexe, l'endonuclease XPG incise l'ADN de 2à9 nucléotides du coté 3' de la lésion.
- Une autre endonuclease XPF/ERCC1 intervient et coupe du coté 5'.
- L'ADN poly γ ou l'ADN III assisté de PCNA et RFC allonge l'extrémité 3', enfin l'ADN ligase I lie les extrémités libres (figure15) (Friedberger et al., 1996).

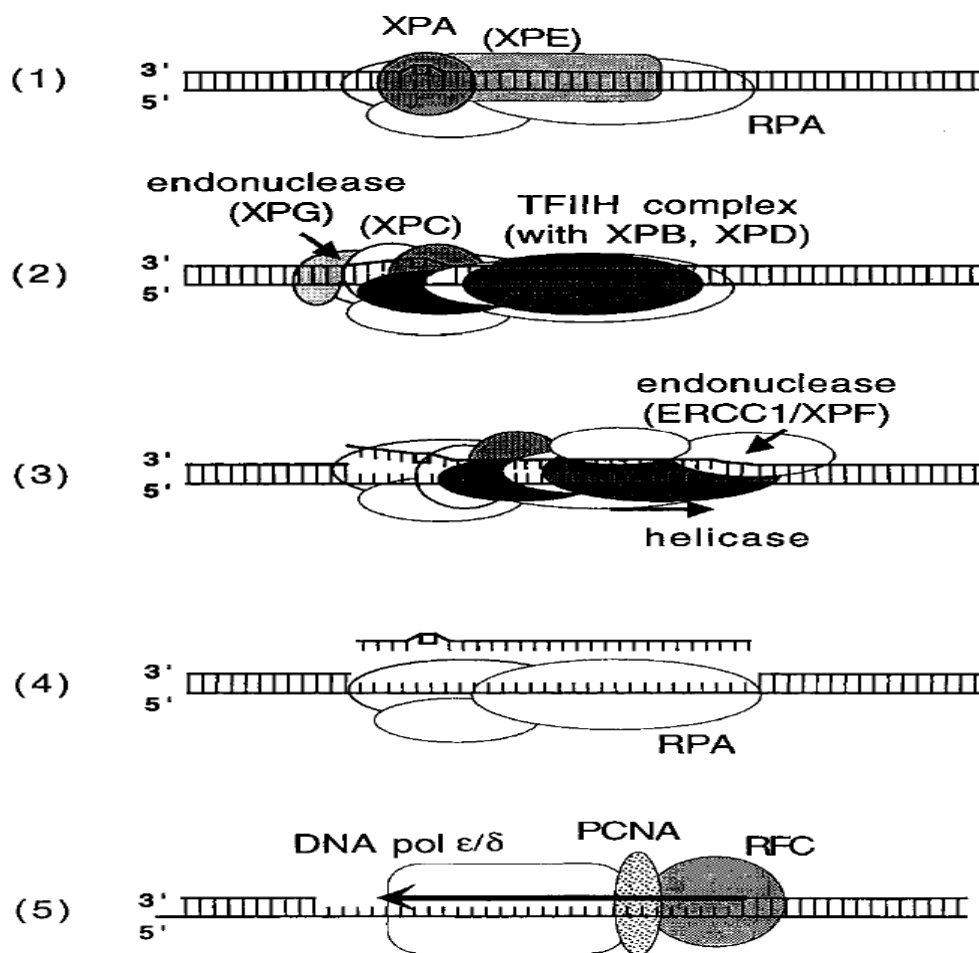


Figure 15 : mécanisme de réparation d'ADN par excision (Friedberger et al., 1996).

III-1-2 Réparation par réversion

C'est le système le plus simple, se fait par l'inversion d'altérations structurales des nucléotides dont l'exemple le plus démonstratif est la photoréactivation des dimères produits par les UV par l'enzyme ADN photolyase (Winter et al., 2006).

III-1-3 Réparation des mésappariements

C'est une réparation des erreurs introduites durant la réplication de l'ADN, en identifiant le mésappariement et le réparer (Clark., 2010).

La MutS α (MSH2/MSH6) reconnaît la lésion et la MutL α (MLH1/PMS2) va se lier en présence de RFC et PCNA, l'endonuclease MLH1/PMS2 va couper le brin et l'exo1/RPA coupe uniquement dans le sens 5' $\rightarrow$ 3' ensuite l'ADN poly β va combler le vide et enfin la ligase I va souder les extrémités libres (figure 16) (Friedberg et al., 1996).

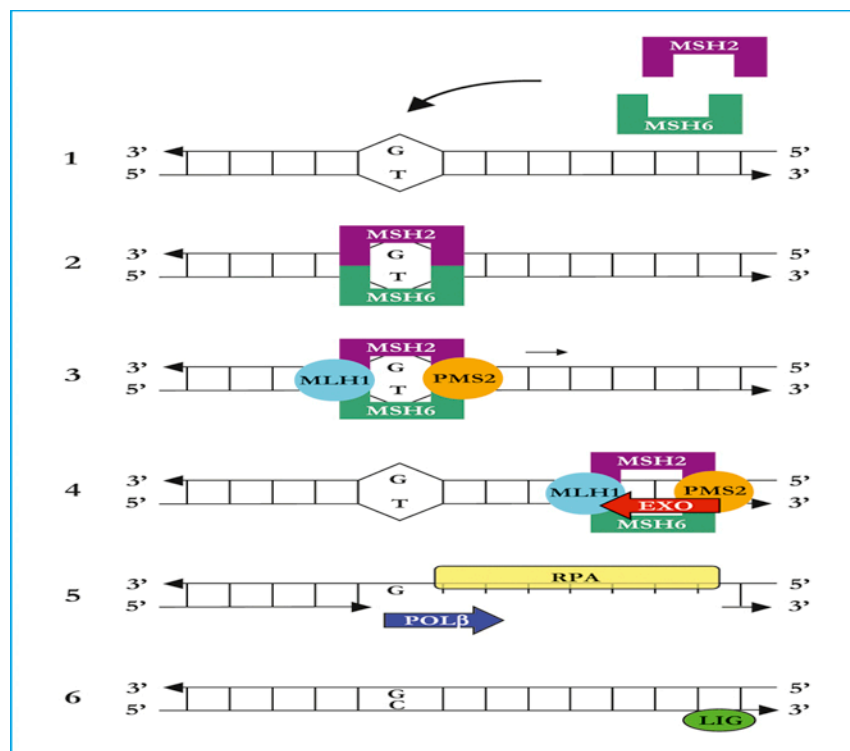


Figure 16 : Mécanisme de réparation des mésappariement (Friedberg et al., 1996).

III-2 Mécanismes antioxydants

Le mécanisme antioxydant est un système de protection contre les radicaux libres en cas d'excès, le métabolisme est capable de les éliminer par des antioxydants intracellulaires de nature enzymatique tels que SOD (superoxyde dismutase), catalase et GTPx (glutathione peroxidase) et ceux de nature non enzymatique tel que vitamine E et C, la ferritine et les oligoéléments (Kakehashi et al., 2013).

De nos jours, l'apport exogène d'antioxydant est préconisé pour la prévention de plusieurs pathologies, tel est le cas des polyphénols qui sont des métabolites secondaires des plantes, ils sont composés de cycle de benzène avec au minimum un groupement hydroxyle associé directement à la structure cyclique (Lopez et al., 2013). Les acides phénoliques représentent les formes les plus simples et les tanins représentent les formes les plus polymérisées de plus de 30000 dalton (Vermerris et al., 2006), les flavonoides font parties des classes les plus importantes des polyphénols et ils sont connus pour leur activité antioxydant (Nigun et al., 2012), qui se manifeste soit par leur pouvoir scavenger, soit par chélation des métaux qui catalyse les réactions de production des EROs et/ou en modifiant l'activité d'une ou plusieurs kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, des protéines telles que kinase A, kinase B, kinase C, JNK1, CDK2 et CDK4 sont activées ou désactivées par ces antioxydants, cela peut se passer directement ou indirectement à travers l'activation de certains facteurs de transcriptions tels que NF-IL6 ou gène P21 et P27 qui sont des suppresseurs de tumeurs, la figure 17 représente les modifications de transduction du signal induites par les composés végétaux avec une activité antioxydante, ces derniers réduisent la protéine kinase A (PKA), PKA réduite est transloquée vers la membrane où elle va phosphoryler le facteur de transcription C/EBP β qui sera transloqué au noyau où il va induire la transcription de P21, ce dernier va provoquer l'inhibition de CDK-2, par conséquent la croissance de la cellule va être bloquée en phase G1. La P21 va aussi se lier à JNK-1 et va inactiver SAPK (stress-activated protein kinase). Les flavopiridoles se lient directement aux CDK en modulant leur activité (Colic et al., 2000).

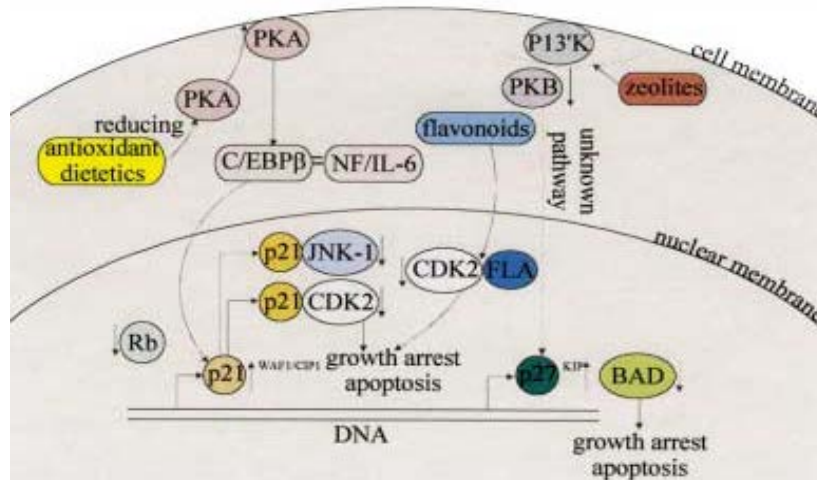


Figure 17: modification de la transduction du signal par les polyphénols(Colic et al.,2000)

III-3 Induction de l'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée résultant le plus souvent d'agression extracellulaire, plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de l'apoptose entre autres bcl2, P53, caspases , Bax (Bernard et al., 1998) , l'apoptose est induite en réponse à des signaux intrinsèques et extrinsèques, les polyphénols font partie des inducteurs de l'apoptose en leur capacité à moduler le taux d'expression des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose (Martin et al., 2002), tel que la P53 qui est inhibée dans des conditions physiologiques par Mdm2 qui interagit aussi dans la progression du cycle cellulaire par la modulation de l'activité de p21 .

Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les polyphénols sont des inhibiteurs de Mdm2 ce qui va induire la surexpression de la p53 (figure18) et la cytotoxicité des cellules cancéreuses .

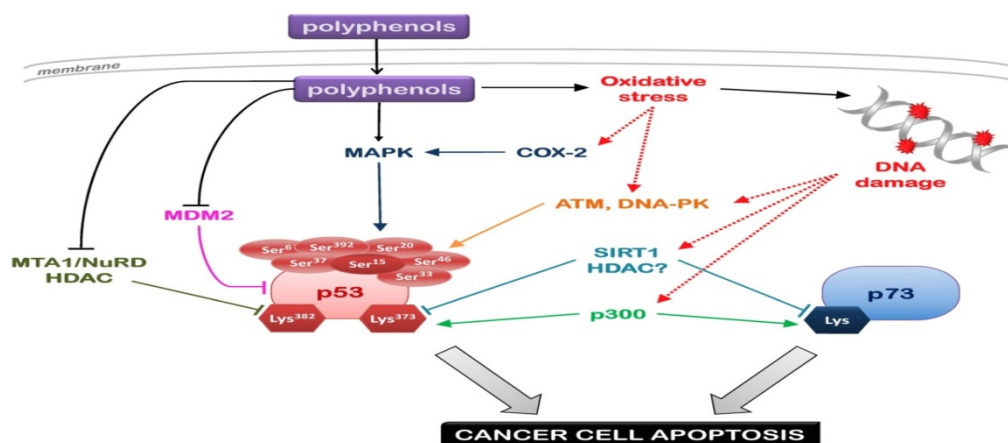


Figure 18 : effet des polyphénols dans les cellules cancéreuses
(Martin et al., 2002)

Comme mentionné précédemment, l'activité de P53 dépend de son niveau d'expression, mais aussi de sa localisation au niveau de la cellule ; d'autres études ont rapporté que les polyphénols ont la capacité de contrôler l'expression et la localisation de la P53 par conséquent son activité pro-apoptotique chez les cellules cancéreuses (Nelly et al ., 2013).

D'autres effets régulateurs des polyphenols ont été décrits qui sont reliés à la phosphorylation et l'acétylation de P53 (Nelly et al ., 2013).

III-4 Détoxification et dégradation

L'élimination des mutagènes se fait grâce à des protéines de détoxification (Kakehashi et al ., 2013) .

Le proteasome est une protéase formée de deux sous-unités. Il a comme fonction la dégradation via la chymotrypsine et la trypsine (Robert et kuhu.,2008).

Les composés exogènes (xénobiotiques) subissent des réactions métaboliques en rentrant dans l'organisme, ces réactions sont classées en 3 grandes classes : réactions de phase 0 qui sont caractérisées par le passage des molécules dans la circulation sanguine, réactions de phase I sont celles qui aboutissent à la modification de la structure de l'exogène et enfin les réactions de phases II permettant l'élimination de l'exogène par l'intermédiaire d'enzymes qui ont la capacité de rendre l'exogène hydrosoluble, ces dernières sont essentiellement la glutathion s-transférase(GST), la UDP-glucuronosyltransférase (UGT) et la quinone réductase (QR) (Robert et kuhu.,2008).

IV-Méthodes d'étude de l'activité mutagénique et antimutagénique

IV-1 Teste de comet :

Le test de Comet aussi appelé SCG (single cell gel assay) est défini pour la première fois par Ostling et Johanson en 1984 comme une technique microélectrophorétique qui permet la visualisation directe des dommages au niveau de l'ADN (Fairbairn et al., 1994).

Ce test présente une très forte sensibilité aux lésions de l'ADN durant l'exposition des cellules à un agent mutagène, c'est un outil très important pour l'étude de la génotoxicité à cause de sa grande sensibilité et la courte durée de sa réponse (Turkoglu., 2012).

Le test de Comet est une technique rapide et quantitative qui permet la visualisation évidente des dommages d'ADN les cellules eucaryotes et qui peut être mesuré. Il est basé sur la quantification des fragments d'ADN dénaturés migrant durant l'électrophorèse (Wenjuant et al., 2009).

Le protocole est simple un ensemble de cellule irradié qui sont suspendu sur le gel d'agarose, puis vont être lysées soit une lyse alcaline ou bien neutre (figure 19) et puis le lysat va subir une électrophorèse et enfin la coloration avec un colorant fluorescent qui permettra la visualisation de l'ADN (Fairbairn et al., 1994).

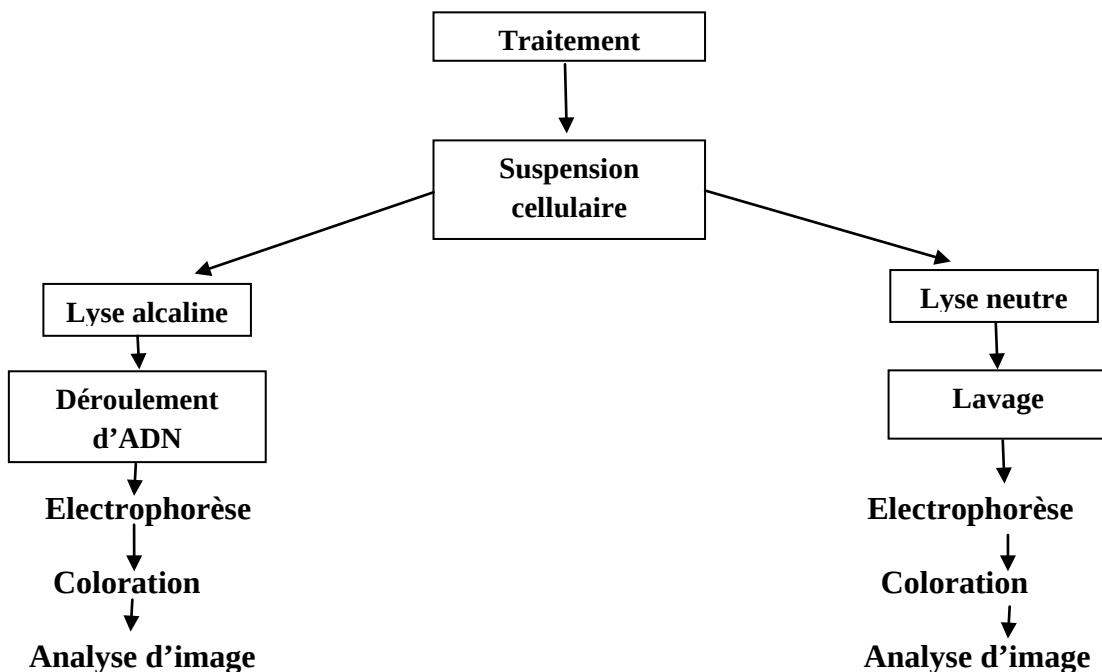


Figure 19 : schéma générale du protocole du teste de comet (Fairbairn et al., 1994)

IV- 2 Test d'Ames :

Le test d'Ames a été spécifiquement développé pour déterminer la mutagénicité induite par les produits chimiques, il a été développé par Burce Ames et il est utilisé dans le monde entier comme un test de détermination du potentiel mutagénique de nouveaux produits chimiques et médicaments (Noushd ,2009).

Le test d'Ames utilise la souche mutante de *Salmonella Typhimurium* qui ne peut pas croître en absence d'histidine c'est-à-dire elles sont auxotrophes pour l'histidine (Mortelmans et al .,2000).

Un extrait de foie de rat (S-9mix) est ajouté parce que les bactéries sont incapables de métaboliser les produits chimiques par le cytochrome P450 comme les mammifères et certains vertébrés. Dans le test d'Ames le mutagène est défini comme un composé permettant la réversion de la première mutation c'est-à-dire que les souches deviennent prototrophes, le protocole est résumé dans la figure 20 (Sebastien ; 2008).

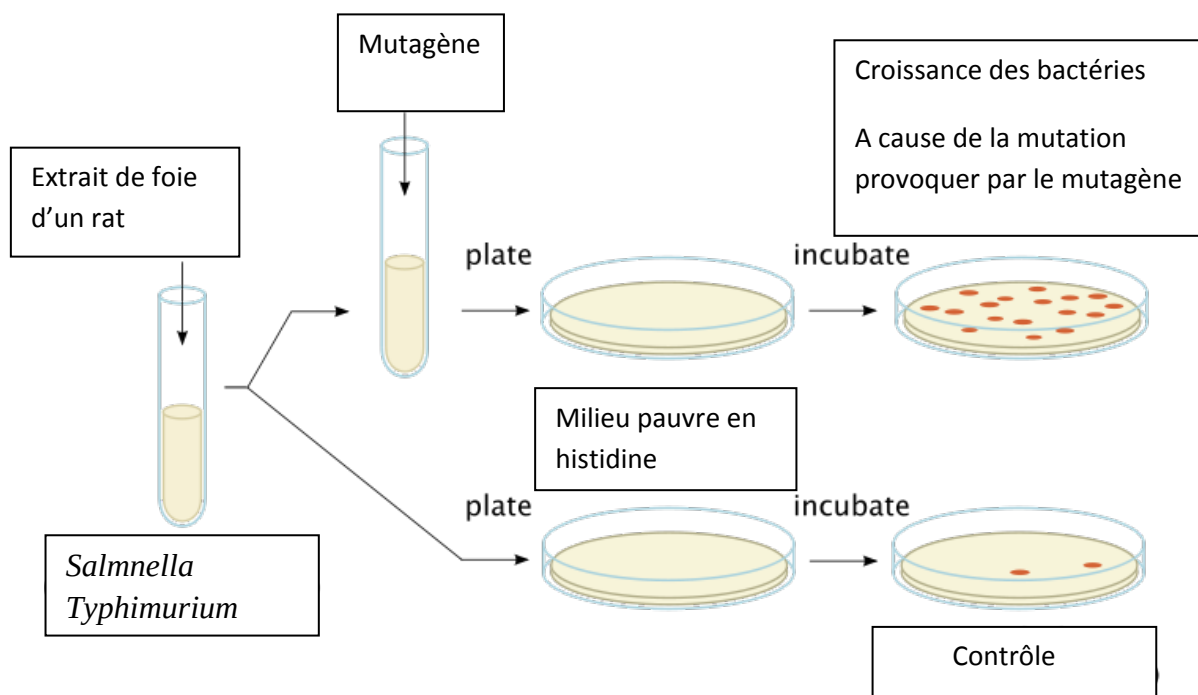


Figure 20 : le protocole du teste d'Ames (Noushd ;2009)

IV-3 Teste *Allium cepa*

Les plantes supérieures sont un important matériel pour les tests génétiques (Khanna et al. 2013), le teste *Allium cepa* a été utilisé depuis 1938 par Leva pour examiner l'effet de la colchicine sur le fuseau mitotique (Santosh et al.,2011 ; Khanna et al. 2013), ce test est utilisé par beaucoup de chercheurs pour l'évaluation du potentiel génotoxique des plantes médicinales, parmi ces avantages : la croissance des racines en contact directe avec la substance d'intérêt et aussi la possibilité d'observer les altérations chromosomiques. (Irfan et al. ,2011) . C'est pour cela que notre choix s'est porté sur cette technique.

Plus de détails sur le protocole de ce teste seront décrit dans la partie matérielle et méthodes.

IV-4 Avantages et limites des méthodes d'étude de la génotoxicité *in vitro*

Il est reconnu que les tests de génotoxicité *in vitro* sont extrêmement utiles, leur organisation est simple et utilise une quantité faible de substances (Ouerdraogo et al. ,2012).

Parmi les limites des tests *in vitro* c'est que ces tests ne se font pas dans des conditions reflétant la véritable physiologie du corps par exemple la température du corps, les interactions cellule-cellule dans les tissus (Ouerdraogo et al. ,2012).

MATÉRIELS ET
MÉTHODES

V- Matériel et méthodes

V-1-Matériel

V-1-1-Produits chimiques

HCl 1N, Ethanol 70%, diméthyl suloxide (DMSO), CaSO₄, MgSO₄, NaHCO₃, KCl, Carmin), Azide de sodium.

V- 1-2- Autres matériels

- Microscope optique de marque ZEISS avec grossissement x 100
- Bain marie de marque MEMMERT
- Etuve de marque BENDER et ECOCELL
- loupe optique de marque ZEISS
- Balance analytique de marque RADWAG
- Sonicateur de marque RAYPA

V-1-3-Matériel végétal

- **Allium cepa** : *Allium cepa* a été choisie pour étudier la génotoxicité car les racines de ce dernier ont une dynamique de croissance très sensible aux polluants, les phases mitotiques de l'*Allium cepa* sont très claires et le caryotype est stable il est diploïde 2n (Tulay., 2010 ; Firbas et al., 2013). Les racines de l'*Allium cepa* présentent une réponse claire et rapide aux substances génotoxiques et en dernier la présence d'aberrations chromosomiques spontanées sont rares (Firbas et al., 2013).

Classification (*Allium cepa*) (breu ., 1996)Tableau II : classification de *Allium cepa*

Règne	plante
Sous règne	Angiospermes
Ordre	Liliales
Classe	Monocotylédones
Famille	Alliacées
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium cepa</i>



Pour l'expérimentation des oignons frais de petits calibres (3 à 4cm de diamètre) ont été utilisés.

- **Description de la plante testée : *Ulmus campestris***

Classification (Baba-Aissa ., 2000)Tableau III : Classification de *Ulmus campestris*

Règne	plante
Embranchement	spermatophytes
Sous embranchement	angiospermes
Classe	Magnoliopsides
Ordre	Urticales
Famille	Ulmaceaes
Genre	<i>Ulmus</i>
Espèce	<i>Ulmus Campestris</i>

L'extrait de plante utilisé est l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris*, obtenu à partir d'une extraction solide/liquide. (poudre/ethanol 1 :4) ;



(a)

(b)

Figure21 : a) *Ulmus campestris* b) écorce de *Ulmus campestris*

- **Description de la plante testée : *Ulmus campestris***

Arbre de grande taille de 30 à 35 m (figure21) (Rameau et al.,1980) à feuille normale et à fleurs hermaphrodites, c'est la seule famille du groupe dans ce cas, les fleurs unisexuée possèdent des rudiments du sexe opposé, l'écorce est très épaisse (Guy., 1976 ; Battandier ., 1978).

- **Usage thérapeutique**

L'écorce intérieure de l'*Ulmus campestris* possède des propriétés stimulantes, sudorifiques, diurétiques et émollientes .On l'utilise avantageusement contre la diarrhée, les affections goutteuses et contre le rhumatisme (Beloued .,2009).

V-2- Méthodes

V-2-1- Préparation des échantillons

Avant tout test de génotoxicité et anti-génotoxicité, la préparation des échantillons (bulbes d'oignons) a été réalisée comme suit :

- Tout d'abord, enlever la première couche des bulbes, et couper les racines déjà présentes sur les bulbes pour permettre la poussée de nouvelles racines.
- Ensuite immerger les extrémités des bulbes dans un milieu de culture (60 mg/l CaSO_4 , 60 mg/l Mg SO_4 , 96 mg/l NaHCO_3 , 4mg /l Kcl), et incuber dans une étuve à 25°C (figure 22)



(a)



(b)

Figure22 : a) bulbe divisée en quatre b) les bulbes incubés dans une étuve à 25°C

- changer le milieu de culture toutes les 24 h pendant 72h.
- diviser en 4 parties les bulbes après 48 h d'incubation (figure22) (comme repère pour les mesures de 18h 24h 48h et 72h)
- subdiviser en 11 groupes (de 06 bulbes) puis immerger dans leur milieu respectif :

*09 groupes pour l'évaluation de l'activité génotoxique de l'extrait : 5 groupes contrôles dont les milieux sont (eau distillé, DMSO, azide de sodium à 25 $\mu\text{g/ml}$, à 50 $\mu\text{g/ml}$ et à 100 $\mu\text{g/ml}$) respectivement, et 4 groupes test pour la détermination de l'effet de l'extrait est à différentes concentrations (à 50 $\mu\text{g/ml}$, à 100 $\mu\text{g/ml}$, à 300 $\mu\text{g/ml}$ et à 400 $\mu\text{g/ml}$)

* 02 groupes pour l'évaluation de l'activité anti-génotoxique de l'extrait (figure23) : un groupe contrôle dont le milieu comporte de l'azide de sodium à 100µg/ml et un groupe test dont le milieu contient de l'azide de sodium à 100 µg/ml et de l'extrait à 100 µg/ml.



Figure 23 : bulbes pour l'évaluation de l'activité anti-génotoxique

V-2-2- Evaluation macroscopique

L'effet de l'extrait sur la croissance et la morphologie des racines ont été évalués en mesurant la longueur des racines prélevées et en observant la forme des modifications morphologiques visibles, comme des changements de la consistance de la racine et la couleur aussi bien que la présence de gonflant, de crochets ou de torsions au niveau des extrémités des racines ont aussi été observés.

Le pourcentage de croissance des racines a été calculé comme suit :

$$IC = \Delta l / L_0 \times 100$$

Δl : différence entre la longueur de la racine avant et après le traitement.

L_0 : longueur de la racine avant le traitement.

V-2-3- Etude cytologique :

Les racines (4 à 5) ont été prélevées dans les zones prédéterminées (18h 24h 48h et 72h) puis fixées pendant 24h dans une solution fixatrice (figure 24).



Figure 24 : les racines dans la solution fixatrice

les racines de chaque bulbe ont été hydrolysées dans du HCl 1N pendant 10min puis colorées avec du carmin acétique à 2% et à 60 °C pendant 15min.

Les extrémités méristématique des racines ont été coupées puis écrasées entre lame et lamelle.

Le nombre moyen total des cellules analysées par bulbe était de 1000 cellules. Les lames ont

été analysées par observation des cellules en différentes phases du cycle cellulaire sous microscope optique avec un objectif x40. La moyenne des cellules dans chaque phase du cycle de division d'*Allium cepa* et le pourcentage de l'indice mitotique ont été calculés comme suit :

$$\text{IM} = (\text{nombre de cellules en division} / \text{le nombre total de cellules}) \times 100.$$

Le pourcentage d'aberration dans chaque groupe a été calculé comme suit :

$$\% \text{Aberrations} = (\text{le nombre d'aberration} / \text{le nombre total de cellules}) \times 100.$$

Le pourcentage de réduction d'aberration a été calculé comme suit :

$$\text{A-C} / \text{A-B} \times 100 \text{ avec}$$

A : Pourcentage d'aberration dans l'azide 100.

C : Pourcentage d'aberration dans l'azide et *U.campestris* 100.

B : Pourcentage d'aberration dans l'eau distillé.

On rajoutera au début « les activités génotoxique soit cytotoxique et anti-génotoxique de l'extrait éthanol de *U. campestris* ont été réalisés en utilisant les tests de *Allium cepa* selon le protocole de Mieczyslaw et al (2006), avec quelques modification.

V-2-4 Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne $\pm$ SEM. L'étude statistique a été réalisée par l'analyse de la variance ANOVA one way du logiciel GraphPad Prism version 5.3, avec Dunett's post-test.

*RÉSULTATS ET
DISCUSSION*

VI-Evaluation macroscopique

VI-1 Evaluation morphologiques

L'évaluation des modifications morphologiques des racines traitées avec l'azide de sodium et l'extrait *U.campestris* a montrée la présence de crochets chez les racines traitées avec de l'azide à 100 µg/ml et l'absence de ces derniers chez les autres groupes (figure 1), on a aussi remarqué la présence d'une coloration marron chez les racines traitées avec l'extrait(figure25).



Figure 25 : a) racines non traitées b) racines traitées avec *U.campestris* c) racines traitées avec l'azide de sodium

VI-1-1 la croissance des racines

Le taux de croissance des racines traitées a été calculé. Les résultats de l'effet de l'azide de sodium et de l'extrait *U.campestris* sont représentés dans la figure 26, le taux de croissance le plus grand a été observé avec l'*U.campestris* après 72h d'incubation et le plus faible avec l'azide de sodium à 100µg/ml après 72 h d'incubation. Une augmentation avec le temps qui se ressemble entre les différents échantillons sauf pour l'azide 100 et ulmus 50

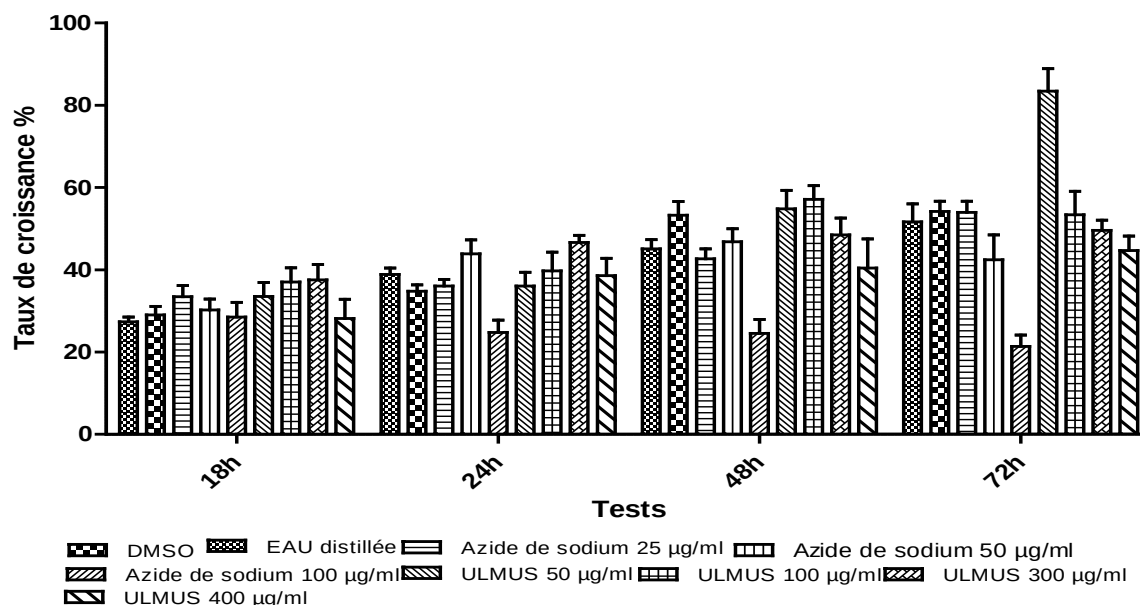


Figure 26 : effet de l'extrait *U. campestris* sur le taux de croissance des racines d'*Allium cepa*

Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ SEM, 6 bulbes dans chaque groupe, L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Graph pad en utilisant le test one-way ANOVA

*Le taux de croissance des racines incubées dans un milieu de culture contenant de l'azide de sodium à 100µg/ml et l'extrait *U. campestris* à 100µg/ml a été calculé , les résultats représenté dans la figure 27 montrent une augmentation du taux de croissance dans le groupe traité avec de l'azide de sodium à 100µg/ml en présence d' *U. campestris* par apport au groupe traité avec de l'azide de sodium seulement .

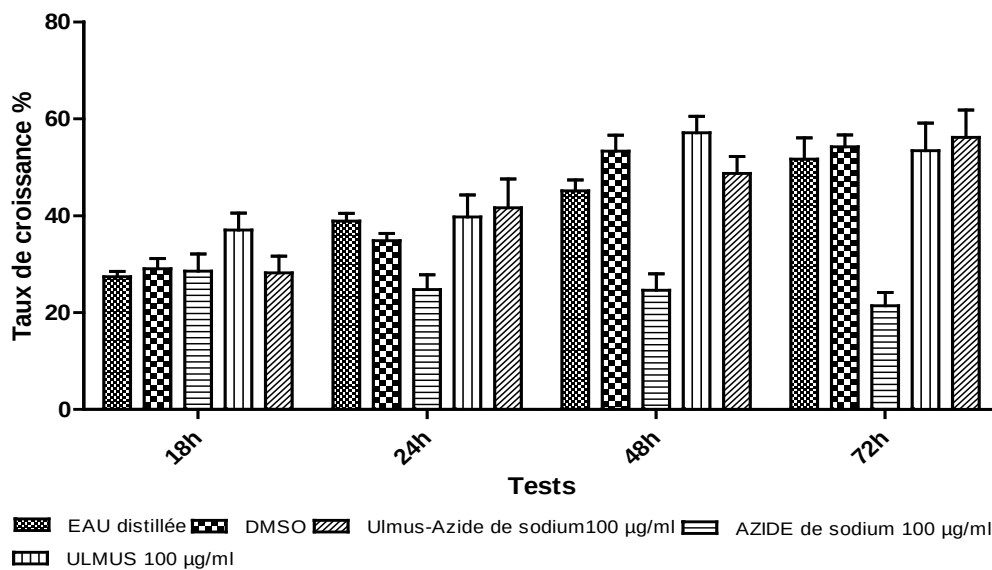


Figure 27 : effet d' *U. campestris* sur le taux de croissance en présence de l'azide de sodium

Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ SEM, 6 bulbes dans chaque groupe, L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Graph pad en utilisant le test one-way ANOVA.

VI-2- Activité cytotoxique

Pour l'évaluation de l'activité cytotoxique a été réalisée en utilisant le teste *Allium cepa*, 1000 cellules par bulbe en différentes phases du cycle cellulaire ont été observées sous microscope optique.

-Pour l'évaluation de l'effet de l'azide de sodium L'indice mitotique caractéristique des groupes traités avec l'azide de sodium à différentes concentrations a été calculé.

On a remarqué la diminution de l'indice mitotique des groupes traités avec l'azide de sodium à toutes les concentrations par rapport au groupe traité avec de l'eau distillée et DMSO et cette diminution continuent avec le temps (figure 28), la valeur la plus faible a été observée après 72 h d'incubation avec l'azide de sodium à 100µg/ml .L'indice mitotique des groupes traités avec l'extrait *Ulmus campestris* a été calculé ,les résultats représentés dans la figure 28 montrent une augmentation de l'indice mitotique par rapport aux groupes traités avec l'azide de sodium et une diminution par rapport au groupe traité avec l'eau distillée sauf pour le groupe traité avec l' *Ulmus campestris* à 100µg/ml après 72h d'incubation .et la diminution n'est significative que chez les racines traité avec l'extrait à 400µg/ml, l'indice mitotique est passé de la moyenne de 64,3% avec l'eau distillée à une moyenne de 51,9 % avec l'extrait à 400µg/ml.

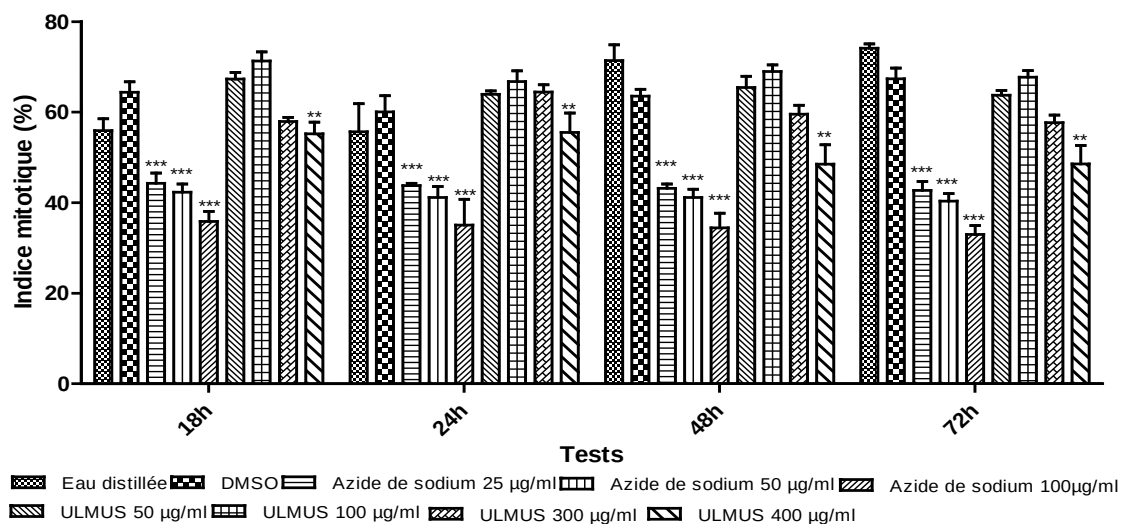


Figure 28 : effet de l'extrait d'*Ulmus campestris* sur l'indice mitotique

Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ SEM, 6 bulbes dans chaque groupe, L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Graph pad en utilisant le test one-way ANOVA, les différences sont significatives à

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle (eau distillé et DMSO)

*le pourcentage d'aberration dans tous les groupes a été calculé et les résultats sont représentés dans le tableau IV

Tableau IV : Pourcentage des aberrations chromosomiques observées dans les cellules d'*allium cepa*

heure		c-mitose	Stiky metaphase	pontage	Chromosome isolé	cassure	Mis segregation	Bi- nucléique	micronoyau
premier prélèvement (18h)	DMSO	-	0,13±0,02	-	-	-	-	-	-
	AZIDE 25	0,17±0,01	-	0,01±0,01	-	-	-	-	-
	AZIDE 50	2,56±0,58	0,34±0,12	-	-	-	0,03±0,03	-	-
	azide 100	1,93±0,38	0,68±0,07	-	-	0,01±0,01	0,06±0,03	0,38±0,03	0,01±0,01
	ulmus 50	0,06±0,03	-	-	-	-	-	-	-
	ulmus300	0,06±0,01	0,07±0,02	-	-	-	0,01±0,01	-	-
	ulmus400	0,26±0,11	0,08±0,05	-	-	-	0,01±0,01	-	-
Deuxième prélèvement (24h)	DMSO	0,07±0,04	0,14±0,06	-	0,01±0,01	-	0,01±0,01	-	-
	AZIDE 25	0,14±0,14		-	-	-	-	-	-
	AZIDE 50	1,18±0,52	0,83±0,22	-	0,01±0,01	-	0,04±0,01	-	-
	azide100	7,01±2,19	0,54±0,17	-	-	-	0,03±0,02	0,54±0,34	-
	ulmus 50	-	-	-	-	-	-	-	-
	ulmus300	0,14±0,06	0,07±0,02	-	-	-	-	-	-
	ulmus 400	1,28±0,48	0,02±0,02	-	-	-	-	-	-
Troisième prélèvement (48h)	DMSO	0,01±0,01	0,01±0,01	-	-	-	-	-	-
	AZIDE 25	0,20±0,11	-	-	0,01±0,01	0,01±0,15	-	-	-
	AZIDE 50	1,59±0,47	0,52±0,20	-	-	-	-	-	-
	azide 100	2,15±0,62	0,21±0,11	-	-	-	-	-	-
	ulmus 50	0,03±0,01	-	-	-	-	-	-	-
	ulmus 300	0,21±0,07	0,01±0,01	-	-	-	-	-	-
	ulmus 400	1,71±0,38	0,06±0,06	-	-	-	-	-	-
Quatrième prélèvement (72h)	DMSO	0,16±0,15	0,01±0,01	-	-	-	-	-	-
	AZIDE 25	0,09±0,07	0,07±0,05	-	-	-	-	-	-
	AZIDE 50	1,03±0,27	0,59±0,20	-	-	-	-	-	-
	Azide 100	3,62±1,35	0,04±0,02	-	-	-	-	-	-
	ulmus 50	-	-	-	-	-	-	-	-
	ulmus300	0,20±0,08	0,19±0,04	-	-	-	-	-	-
	ulmus400	2,82±0,59	0,08±0,03	-	-	-	-	-	-

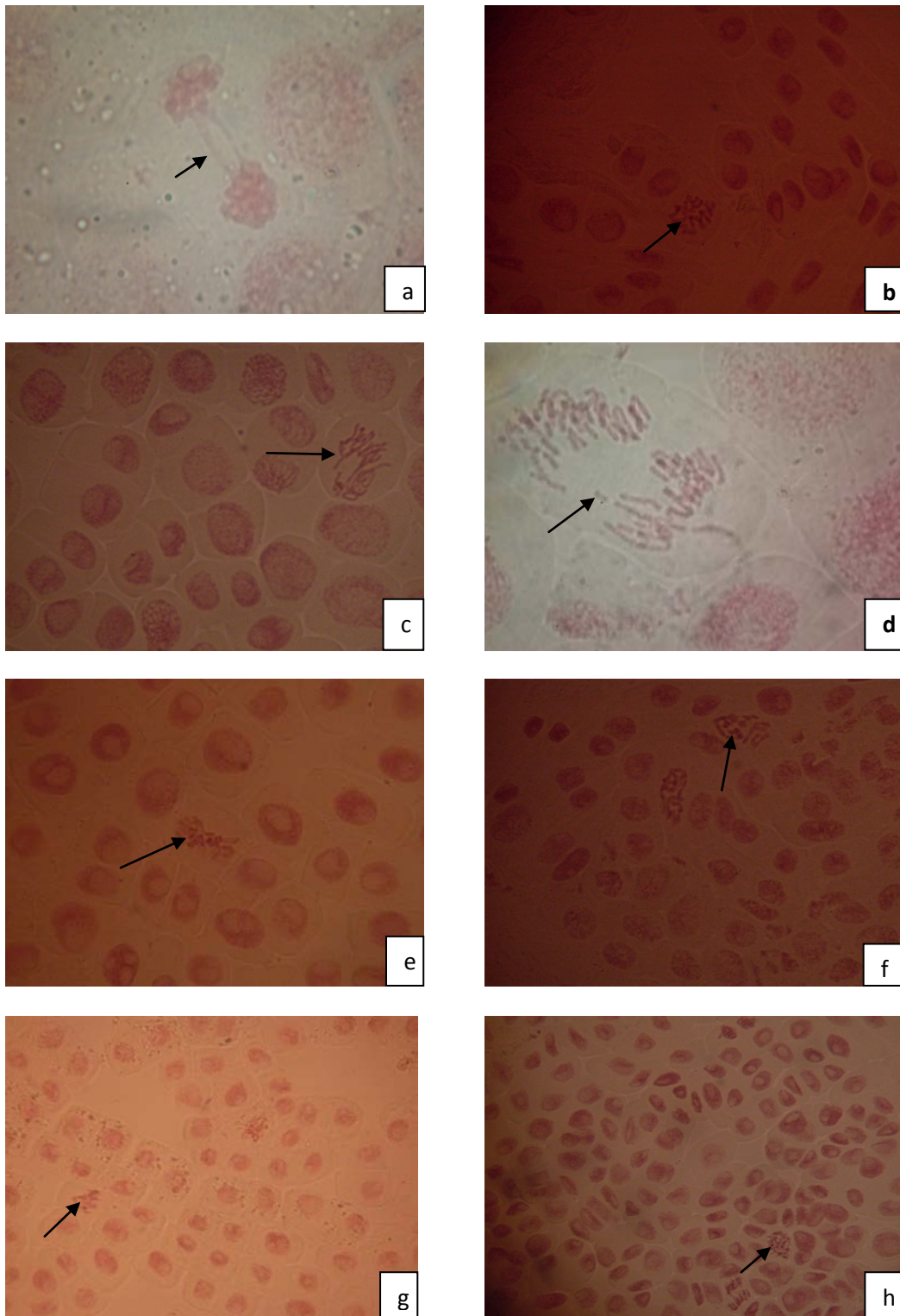


Figure 29: les différentes observations des cellules d'*allium cepa* qui ont subi le traitement avec l'azide de sodium à 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a : pontage b :c-mitose c :mis ségrégation d : cassure e : c-mitose f : c-mitose g : stiky metaphase h : c-mitose

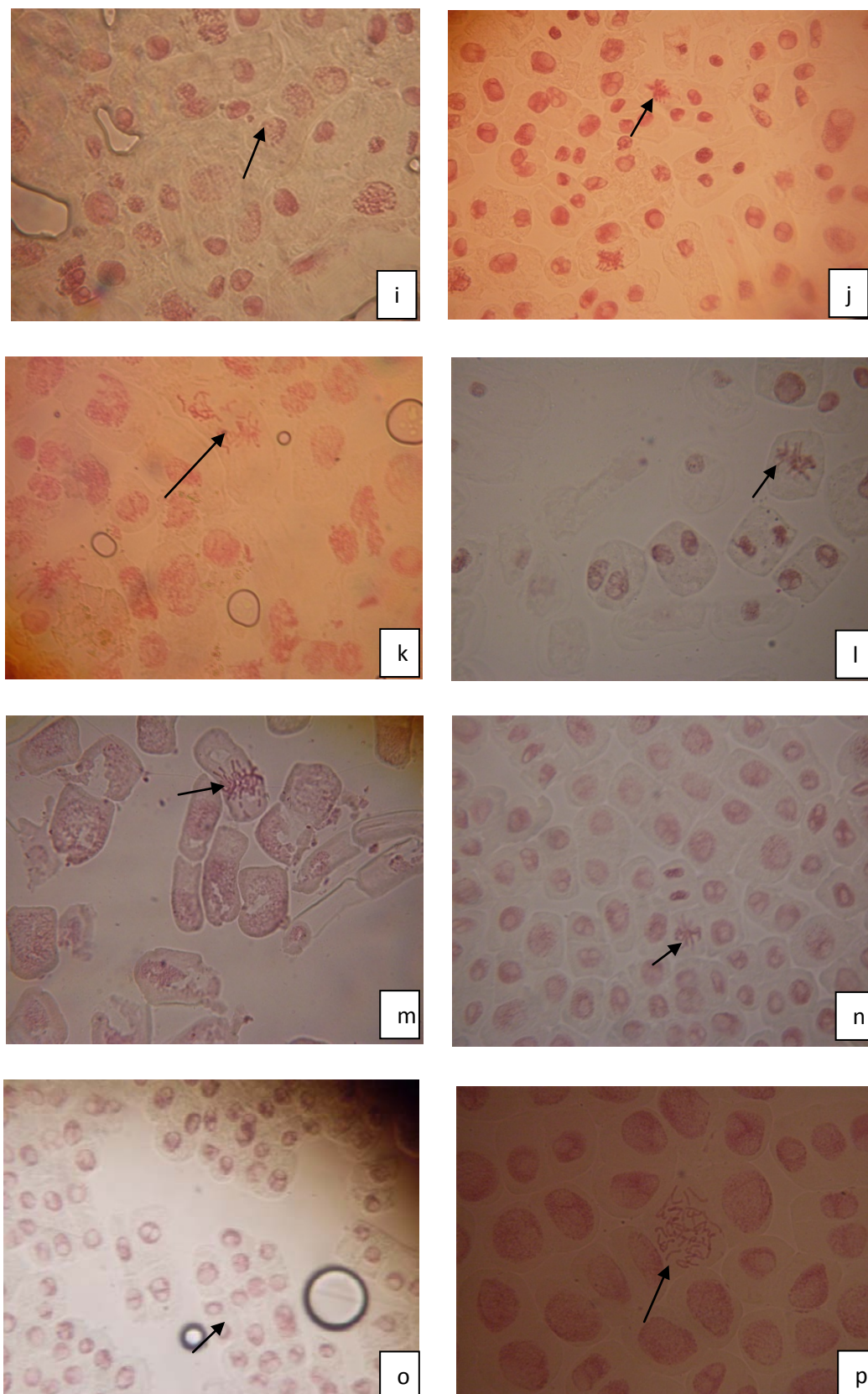


Figure 30 : les différentes observations des cellules d'*allium cepa* qui ont subi le traitement avec l'azide de sodium à 100µg/ml i : micro-noyau j : stiky metaphase k :mis segregation l : stiky metaphase m : cassure n: stiky metaphase o : binuclcléique p : mis segregation

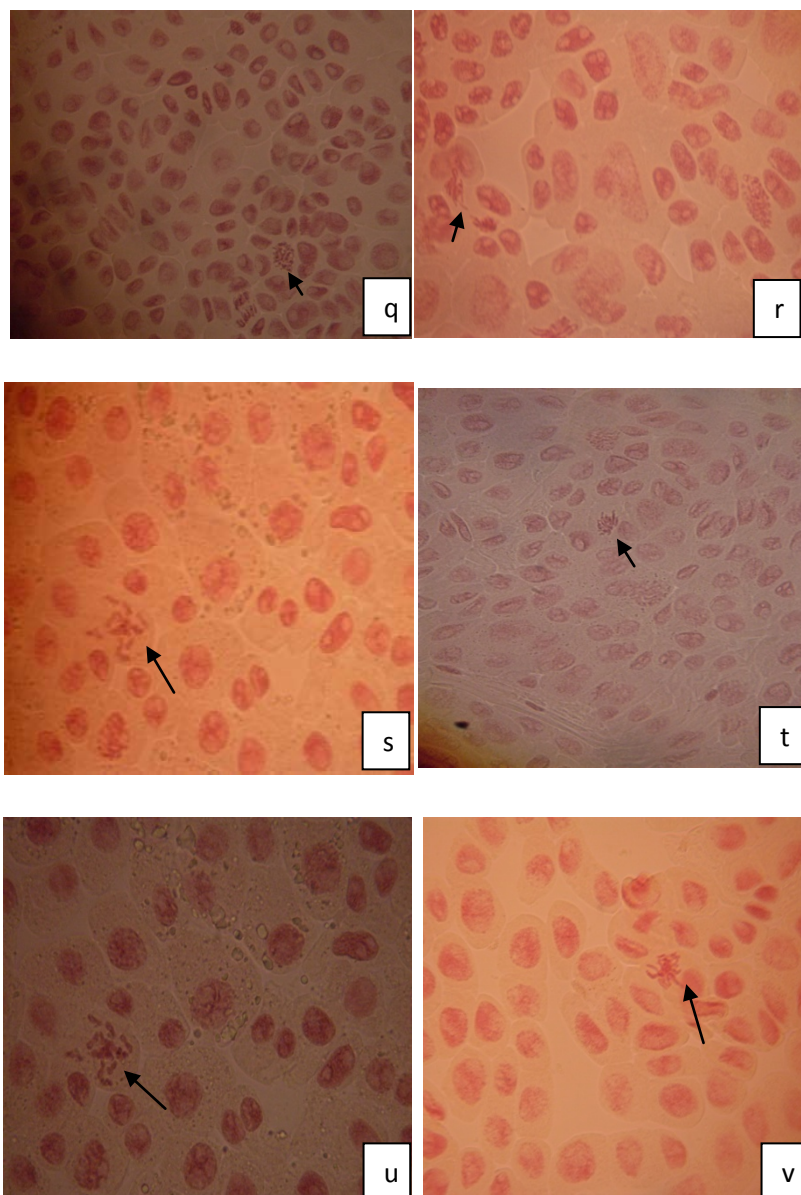


Figure31: les différentes observations des cellules d'*allium cepa* qui ont subi les testes d'activité génotoxique q : c-mitose r : chromosome isolé (azide à 50 µg/ml) s : mis segregation (*Ulmus campestris* à 400 µg/ml) t : sticky metaphase (*Ulmus campestris* à 300 µg/ml) u : mis segregation (*Ulmus campestris* à 300 µg/ml) v : sticky metaphase (DMSO)

VI-3-Activité anti-génotoxique

L'activité anti-génotoxique d'*Ulmus campestris* a été également évaluée. L'indice mitotique et le pourcentage de réduction d'aberrations des groupes traités avec la combinaison Azide de sodium et *U. campestris* ont été calculés, les résultats sont représentés respectivement dans les figures 30 et 31.

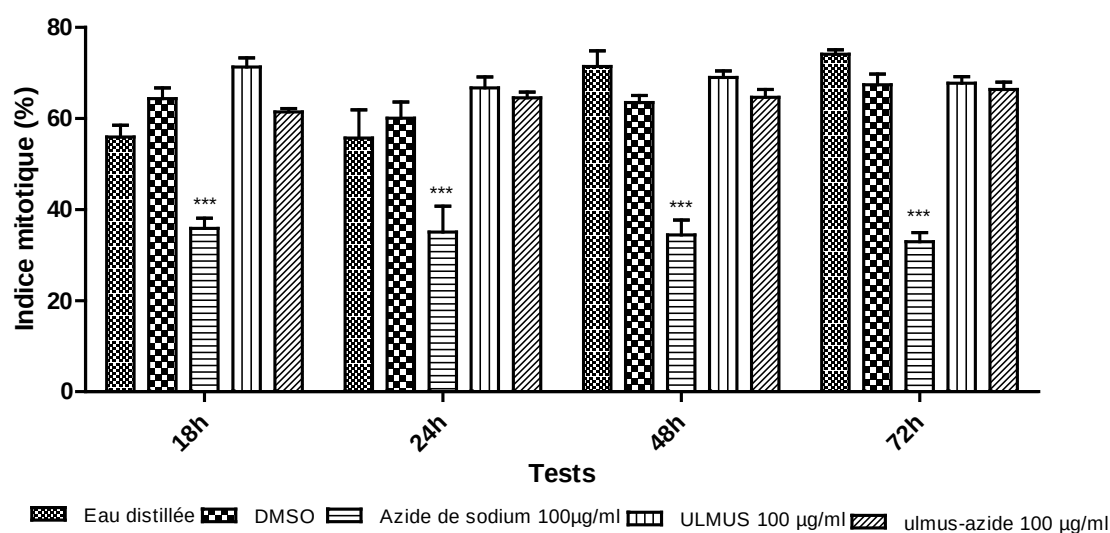


Figure 32 :l'effet d'*Ulmus campestris* sur l'indice mitotique en présence de l'azide de sodium

Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ SEM, 6 bulbes dans chaque groupe L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Graph pad en utilisant le test one-way ANOVA, les différences sont significatives à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle (eau distillé et DMSO)

*Les résultats représentés dans la figure 32 montrent une augmentation de l'indice mitotique du groupe traité avec l'extrait *Ulmus campestris* en présence de l'azide de sodium par rapport au groupe traité avec l'azide de sodium seul et les résultats représentés dans la figure 33 montrent que le pourcentage de réduction d'aberrations le plus élevé est de 87,94%.

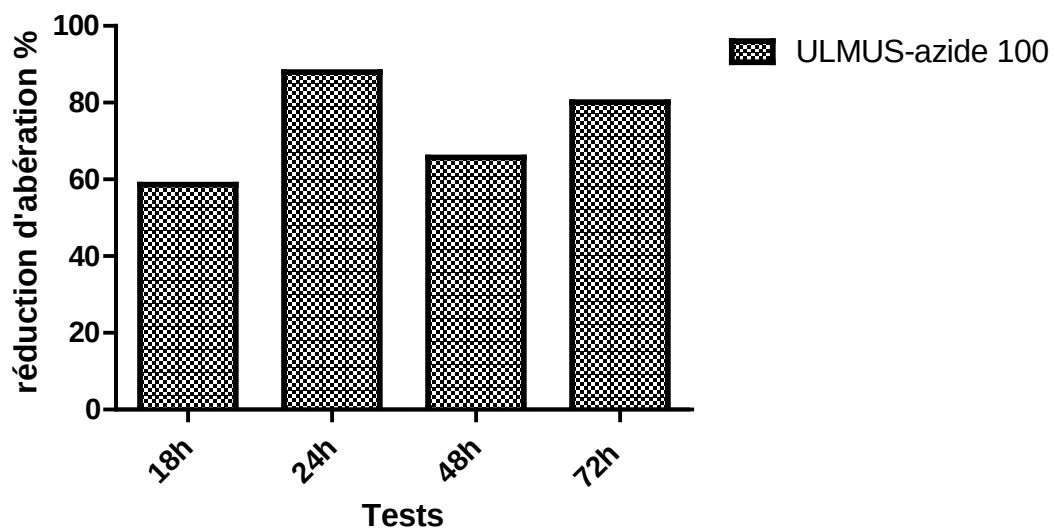
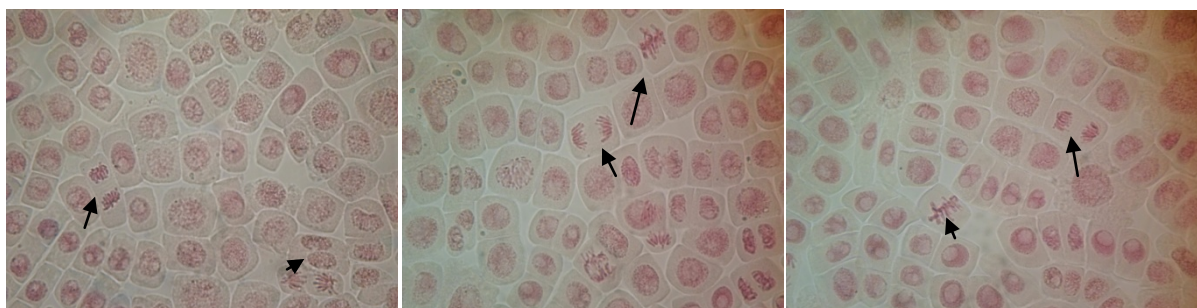


Figure 33 : effet d'*Ulmus campestris* sur le pourcentage d'aberration

*Le pourcentage d'aberration le plus élevé a été observé après 24 h d'incubation



(A)



(B)

Figure 34 : A : observation des racines traitées avec l'azide de sodium à 100µg/ml B : observation des racines traitées avec l'azide de sodium et *ulmus campestris* à 100µg/ml

VII-Discussion

Les produits naturels surtout ceux d'origine végétale sont des sources thérapeutiques importantes (Deborah et al., 2013).

En raison de l'utilisation de plus en plus intensive des plantes médicinales, des études sur leurs propriétés sont nécessaires pour contribuer à une utilisation plus efficace.

Dans le but d'évaluer l'effet génotoxique et antigénotoxique de l'extrait *Ulmus campestris*, on a sélectionné le modèle *Allium cepa* qui est souvent utilisé pour déterminer la génotoxicité et cytotoxicité des produits chimiques (Otinothy et al., 2013) à travers l'étude macroscopique et microscopique qui permet de déterminer l'indice mitotique et d'observer les aberrations chromosomiques induites par les produits chimiques .

Lors de l'évaluation macroscopique on a remarqué la formation de petits crochets au niveau des racines traitées avec l'Azide de sodium à 100µg/ml et une diminution du taux de croissance par rapport au groupe traité avec l'eau distillé qui est peut être due à la mutagénicité de l'azide de sodium (Nassreen et al., 2013), on a aussi remarqué la coloration marron des racines traitées avec l'extrait de *Ulmus campestris* , cette coloration a été observée dans d'autres études avec l'extrait de feuilles d'*I.viscosa* (Tulay et al .,2010) qui serait due au pigment.

Parmi les observations macropsopiques, nous nous sommes intéressés à la croissance (taille des racines) des racines en présence du mutagène et en présence de l'extrait à différentes concentrations, qui a été exprimée en taux de croissance (%). Ce paramètre est important car il permet d'ores et déjà d'estimer l'effet de l'azide et de l'extrait sur la prolifération cellulaire. Il a été observé que le taux de croissance des racines de *Allium cepa* augmente en fonction du temps d'incubation (18h ,24h ,48h ,72h), tous les échantillons ont présenté approximativement le même profil à l'exception de l'azide à 100µg/ml où une diminution de la croissance a été remarquée surtout à 72h nous laissant penser que l'azide de sodium a inhibé la croissance des racines d'*Allium cepa*, par l'arrêt de la division cellulaire ce qui pourrait être expliqué par sa mutagénicité, qui est méditée à travers la production d'un métabolite d'un composé d'azide qui est amino acidanalogue L- azidoalanine($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$)(Owais et Kleinhofs, 1988).ce métabolite entre dans le noyau, interagi avec l'ADN et crée des mutations au niveau du génome . (Khan et al .,2009) ,même si aucune significativité n'a été retrouvée après étude statistique.

Un autre aspect macroscopique a été évalué celui de l'effet de l'extrait sur la croissance des racines en présence du mutagène. Le taux de croissance des racines augmente en fonction du temps d'incubation de la même manière qu'en absence d'azide. Ceci pourrait être expliqué par l'action antimutagénique de l'extrait grâce à sa composition en polyphénols qui sont une source d'antioxydant qui présente une protection à l'ADN (phanikumar et al. 2013).

Pour compléter les résultats de l'étude macroscopique, nous avons réalisé une étude cytologique en calculant l'indice mitotique qui est relié à la prolifération des cellules d'un tissu et il est défini comme étant le rapport entre le nombre de cellules en mitose sur le nombre total des cellules (Khan et al, 2009), La diminution de l'indice mitotique reflète la cytotoxicité (Kawan et al .,2012) et elle est peut être due à l'inhibition de la synthèse d'ADN ou à un blocage des cellules en phase G2 du cycle cellulaire (Namita et al .,2013) . La diminution de l'indice mitotique en dessous de 22% du contrôle provoque un effet létale (Irfan et al.,2011) et si la diminution est de 50% c'est un effet subléta appelé la valeur limite toxique (Tulay et al .,2010) .

L'indice mitotique des groupes contrôles a été calculé et les résultats suggèrent la cytotoxicité de l'Azide de sodium (figure 28) puisque l'indice mitotique des groupes traités avec l'azide de sodium à 25µg/ml, 50µg/ml et 100µg/ml diminue significativement par rapport à celui du contrôle négatif et cette diminution est directement proportionnelle au temps, cela peut être expliqué par la déficience en ATP causée par l'azide de sodium, De plus, l'azide de sodium est supposé induire un changement dans le Ca^{2+} cytosolique à travers l'inhibition de l'AMPC et l'inhibition de calmoduline (Khan et al, 2009) .

L'analyse des résultats de l'indice mitotique pour les racines traitées avec l'*Ulmus campestris* à différentes concentrations à 50µg/ml, 100µg/ml, 300µg/ml, 400µg/ml (figure 28) ne montre pas de différence significative de l'indice mitotique par rapport aux racines traitées avec l'eau distillée hormis celles traitées avec l'*Ulmus campestris* à 400µg/ml .

La diminution significative de l'indice mitotique chez les racines traitées avec l'*Ulmus campestris* à 400µg/ml suggère sa cytotoxicité pour cette concentration, qui est peut être due à la richesse de l'extrait en tanins qui provoquerait la précipitation et l'inhibition des protéines du cycle cellulaire (Teixeira et al ., 2003) ,d'autres études ont montré qu'une grande concentration d'acides gallique a un grand effet cytotoxique sur les cellules cancérigènes.

L'effet mitodepressif de certains extraits de plantes incluant leur capacité à bloquer la synthèse de l'ADN a fait l'objet de plusieurs études (Tulay et al., 2010), et les résultats de ces dernières suggèrent que cet effet est dû à la composition de ces extraits en polyphénols qui bloquent les voies de transduction de signal telles que la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la voie PI3 kinase (phosphatidyl inositol-3 kinase) et la voie d'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B).

Plusieurs études ont rapporté la cytotoxicité de certaines plantes utilisées dans la médecine traditionnelle si elles sont consommées au-dessus de certaines concentrations, bien que leur potentiel thérapeutique soit aussi confirmé (Selestin et al., 2013).

Des résultats similaires ont été observés avec l'extrait aqueux d'*Arctium lappa* qui est cytotoxique à des concentrations élevées (Khakdan et al., 2012),

La diminution de l'indice mitotique est en relation avec l'augmentation du taux des aberrations chromosomiques, ces dernières sont des changements au niveau de la structure des chromosomes (Otimothy et al., 2013).

L'azide de sodium est le principal mutagène environnemental, il cause une sévère génotoxicité aux plantes par l'inhibition de la synthèse et la réplication d'ADN, sa génotoxicité a déjà été démontrée dans plusieurs études (Nasreen et al., 2013), les aberrations induites par l'azide de sodium dans cette étude (tableau IV) sont c-mitose, sticky metaphase, chromosome isolé, mis segregation, binucleique et micronoyau.

La fréquence des c-mitose chez les cellules est maximale par rapport aux autres aberrations, le pourcentage le plus élevé a été observé avec l'azide de sodium à 100 µg/ml après 24 h d'incubation avec un pourcentage de 7,01±2,19.

La c-mitose n'est pas très toxique (Kawan et al., 2012), elle est le résultat de l'empêchement de l'assemblage des fibres du fuseau ce qui provoque la dispersion des chromosomes au niveau de la cellule (Namita et al., 2013).

Par contre la sticky metaphase a un effet très toxique et irréversible, elle mène à la mort cellulaire (Kwan et al., 2012).

Dans cette étude la fréquence des pontages est faible, ils ont été observés juste avec l'azide de sodium à 25 µg/ml après 18 h d'incubation (tableau IV), les pontages sont formés par cassure et fusion de chromatides. (Kwan et al., 2012).

Certaines aberrations peuvent augmenter le risque d'aneuploïdie, tel est le cas du chromosome isolé qui est causé par la distribution inégale des chromosomes ce qui crée une disjonction. (kawan et al ., 2012) , dans notre étude il a été observé avec l'azide à 50µg/ml après 24h d'incubation et l'azide à 25 µg/ml après 48 h d'incubation .

Toutes substances capables d'induire des micronoyaux sont génotoxiques (Namita .,2013), les micronoyaux ont été observés avec l'azide de sodium à 100µg/ml après 18h d'incubation , ils peuvent se développer à partir d'un chromosome isolé (Namita .,2013).

L'extrait *Ulmus campestris* induit lui aussi des aberrations mais avec un pourcentage moins important que celui observé avec l'Azide de sodium.

La c-mitose est l'aberration la plus fréquente pour les racines traitées avec l'extrait, Le pourcentage le plus élevé a été observé avec l'*Ulmus campestris* à 400µg/ml après 72h d'incubation avec un pourcentage de $2,83 \pm 0,59$.

Les stiky metaphase ont été observés avec l'extrait mais avec de faibles pourcentages, c'est aussi le cas des mis ségrégations qui ont été observé avec l'*U.campestris* à 300 et 400µg/ml.

On a remarqué l'absence d'aberration chez les racines traitées avec l'*Ulmus campestris* à 100µg/ml, ce qui peut être expliqué par sa composition en flavonoïdes qui possède la capacité de protéger les cellules des dommages des rayons x, inhiber les mutations et aussi prévenir plusieurs étapes de la carcinogénèse (Reddy ., 2003).

Pour l'évaluation antimutagénique d'*Ulmus campestris* on a utilisé l'extrait à la concentration qui n'a pas présenté d'aberrations chromosomiques.

L'indice mitotique des racines traitées avec la combinaison extrait à 100µg/ml et Azide de sodium à 100µg/ml augmente en fonction du temps d'incubation (figure 32), On a trouvé qu'il n'y avait pas de différence significative par rapport à celui des racines traitées avec l'eau distillée et le DMSO, toute fois on a constaté une augmentation significative de cet indice par rapport aux racines traitées avec l'azide de sodium à 100µg/ml seul ,cette augmentation d'indice mitotique est accompagné d'une réduction du pourcentage d'aberration par rapport au pourcentage observé chez les racines traitées avec l'azide de sodium seul , l'analyse des résultats du pourcentage de réduction d'aberrations chromosomiques(figure 33) montre que cette dernière atteint son maximum après 24 h d'incubation avec un pourcentage de 87,94%.

Selon l'étude de Nasreen et al (2013) sur l'évaluation de l'activité antigénotoxique du curcumin, la réduction du pourcentage d'aberrations chromosomiques reflète un potentiel antigénotoxique ceci peut nous conduire à suggérer que l'extrait *Ulmus campestris* a lui aussi un potentiel antigénotoxique.

L'étude d'Aslanturk et al suggère la présence d'un potentiel antigenotoxique après l'observation de la réduction du pourcentage d'aberrations chromosomiques par apport au contrôle positive.

L'activité anti génotoxique d'écorce de *Ulmus campestris* est peut-être due à sa composition qui est riche en flavonoïdes qui sont connue pour leurs propriétés antimutagéniques par leur capacité à interagir avec les radicaux libres et les substances produites par le stress oxydatif(Deborah et al .,2013).

CONCLUSION

Conclusion

D'après les résultats de cette étude, il semble que l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* qui est fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle présente un effet cytotoxique à une concentration de 400µg/ml, d'autre part il présente un effet antigénotoxique à une concentration de 100µg/ml contre les dommages induits par le mutagène azide de sodium, par conséquent, il est nécessaire de tester d'autres concentrations pour confirmer ce résultat et déterminer la dose létale 50(LD 50). Pour les observations microscopiques aucune aberration notable n'a été observée. Par contre une diminution de ces dernières par l'extrait en présence du mutagène sont à noter.

Cependant des études complémentaires s'imposent pour confirmer d'une part l'activité antigénotoxique et d'autre part la cytotoxicité de la plante. Il serait préférable de compléter ce test par l'utilisation d'un modèle animal, et l'évaluation de l'activité antimutagénique contre des aberrations chromosomiques induites par un autre agent mutagène comme par exemple les UV .Ou d'autres tests comme le test d'Ames.

Comme il serait intéressant d'isoler et de caractériser le principe actif responsable de ces activités.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

References bibliographiques

- Andrew W. Murray.,(1995). The genetics of cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Genetics and Development* , 5:5-11.
- Alain Raindoux., (1997). *Biochimie dynamique*. Belgique : De Boeck & Larcier. 691-692.
- Abdelkader Beloued .,(2009). *Plante médicinale*. 5^e éd. Alger : Office des publications universitaires. 150P
- Ali İrfan İlbaş., Umut Gönen., Semih Yilmaz., Mehmet Yaşar Dadandi.,(2011). Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells. *Turk J Bot* 36 : 263-268.
- Anna Kakehashi., Min Wei., Shoji Fukushima., Hideki Wanibuchi.,(2013). Oxidative Stress in the Carcinogenicity of Chemical Carcinogens. *Cancers*, 5, 1332-1354.
- Ahmed S.A.Harabawy ., YahiaY.I.Mosleh., (2014). The roleofvitaminsA, C,Eandseleniumasantioxidantsagainst genotoxicityandcytotoxicityofcadmium, copper, leadandzinc on erythrocytesofNiletilapia, *Oreochromisniloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*104 28–35.
- Bruneton Jean., (2009). *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales*. 4^e éd. Paris : Lavoisier. 259-300.
- Catherine A. Rice-evans., Nicholas J. Miller.,George Paganga., (1995). STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 20, No. 7, pp. 933-956.
- Claire G Cupples ., (2001). *Mutagenesis Mechanisms*. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*.

- David Brusick ., (1987). Principles of Genetic Toxicology. 2e éd. New York: Plnum Press. 44-50.
- Daryl W. Fairbairn a., Peggy L. Olive b., Kim L. O'Neill a., (1994).The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 339, 37-59.
- Daryl S.Henderson., (2005). DNA Repair Protocols: Mammalian Systems. New Jersey: Humana Press. 9-20.
- David O.Morgan., (2007). The cell Cycle: Principles of control. London: New Science Press. 2- 9.
- David P.Clark., (2010). Molecular Biology: Academic cell. USA: Update. 333-367.
- Didier Grunwald.,Jean-François Mayol., Xavier Ronot .,(2010). Cycle cellulaire et cytométrie en flux. Paris : Lavoisier. 2p.
- Deborah S. B. S. Silva., Benhur Barboza., Anuska C. F. S.Garcia., Betejane de Oliveira., Charles S. Estevam., Vitor A.Neto., Andre L. L. M. Santos., Antonio S. Dias., Ricardo Scher.,Silmara M. Pantaleao., (2013). Investigation of protective effects of *Erythrina velutina* extract against MMS induced damages in the root meristem cells of *Allium cepa*. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn. 23(2).
- Emira Mehinagic., Erwan Bourles., Frédérique Jourjon.,(2011). Composés des fruits d'intérêt nutritionnel: impact des procédés de transformation sur les polyphénols. Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture, vol. 43 (6): 364-368.
- Guy Deysson., (1976).Organisation et classification des plantes vasculaires. Paris: SEDES. 211p.

- Giulia Di Carlo., Nicola Mascolo., Angelo A. Izzo., Francesco Capasso.,(1999). FLAVONOIDS: OLD AND NEW ASPECTS OF A CLASS OF NATURAL THERAPEUTIC DRUGS. Life Sciences, Vol. 65. No. 4. pp. 337-353.
- G. Phani Kumar ., K. Navya., E.M. Ramya ., M. Venkataramana ., T. Anand ., K.R. Anilakumar.,(2013). DNA damage protecting and free radical scavenging properties of Terminalia arjuna bark in PC-12 cells and plasmid DNA. Free Radicals and Antioxidants 3, 35e39.
- Ilan R.Kirsch.,(1993). The Causes and Consequences of Chromosomal Aberrations. USA: CRC Press. 1-29.
- Irniger S., (2002). Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of cdc20. FEBS Lett 532: 7-11.
- Iain B. Lambert ., Timothy M. Singer ., Sherri E. Boucher .,George R. Douglas.,(2005). Detailed review of transgenic rodent mutation assays. Mutation Research 590 ,1–280.
- Jack J.Pasternak., (1999). Génétique moléculaire humaine: une introduction aux mécanismes des maladies héréditaires. 1^{re} éd. Belgique : De Boeck. 27-31.
- Jean Bruneton., (2009). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4^e éd. Paris : LAVOISIER.
- Kristien Mortelmans., Errol Zeiger., (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research 455 ,29–60.
- Karamali Khanbabaee ., Teunis van Ree.,(2001). Tannins: Classification and Definition. Nat. Prod. Rep, **18**, 641–649.
- Kwan Yuet Ping., Ibrahim Darah., Umi Kalsom Yusuf., Sreenivasan Sasidharan., (2012). Genotoxicity of *Euphorbia Hirta* on *Allium Cepa* Assay. IPCBEE vol. 39.

- Kwan Yuet Ping ., Ibrahim Darah ., Umi Kalsom Yusuf ., Chen Yeng ., Sreenivasan Sasidharan .,(2012). Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules* , 17, 7782-7791.
- Khakdan Fatemeh ., Piri Khosro., (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous root extract of *Arctium lappa* on *Allium cepa* Linn root tip cells. International journal of Agronomy and Plant Production. Vol., 3 (12), 630-637.
- L. Meijer., (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 5: 311-326.
- L. Reddy., B. Odhav., K.D. Bhoola., (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 99,1– 13.
- L.T. Wu., C.C. Chu., J.G. Chung ., C.-H. Chenc., L.-S. Hsu., J.-K. Liu., S.C. Chen., (2004). Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutation Research* 556, 75–82.
- Lynn B.Jorde; John C.Carey ., Michael J.Bamshad., Raymond L.Withe.,(2004). *Génétique medical*. USA : Elsevier. 26P.
- L.M. Ramirez-Lopez., W. McGlynn ., C.L. Goad ., C.A. Mireles Dewitt.,(2013). Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. *Food Chemistry* 149, 15–24.
- MmAL Dizdaroglu. , (1991). CHEMICAL DETERMINATION OF FREE RADICAL-INDUCED DAMAGE TO DNA. *Free Radwal Biology & Medicine*, Vol. 10, pp. 225-242.
- M.Pagano., (1998). *Cell Cycle Contol: Results and Problems in Cell Differentiation*. New York: Springer. 1-24.

- Miroslav Colic., Kresimir Pavelic.,(2000). Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *Journal of Molecular Medicine*.
- M. Idaomar ., R. El Hamss., F. Bakkali ., N. Mezzoug., A. Zhiri ., D. Baudoux., A.Muñoz-Serrano .,V. Liemans ., A. Alonso-Moraga .,(2001). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster* . *Mutation Research* 513, 61–68.
- Marc Maillet ., (2002). *Biologie cellulaire*. 9^e éd. Paris : MASSON. 257-265.
- Mieczysław Kuras., Julita Nowakowska., Elwira Sliwinska., Radosław Pilarski., Renata Ilasz., Teresa Tykarska., Alicja Zobel., Krzysztof Gulewicz., (2006). Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA,content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 211–221.
- Marc Diederich., (2008). *Natural Compounds in Apoptotic Cell Signaling Pathways*. USA: New York Academy of sciences.138-162.
- Mohammed Noushad., Thirumulu Ponnuraj Kannan., Adam Husein., Haswati Abdullah., Abdul Rashid Ismail., (2009). Genotoxicity evaluation of locally produced dental porcelain – An in vitro study using the Ames and Comet assays. *Toxicology in Vitro* 23, 1145–1150.
- Monica Leopoldini., Nino Russo., Marirosa Toscano.,(2010). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125, 288–306.
- Moustapha Ouedraogo., Thomas Baudoux., Caroline Stévigny., Joëlle Nortier., Jean-Marie Colet., Thomas Efferth., Fan Qu., Jue Zhou., Kelvin Chan., Debbie Shaw., Olavi Pelkonen., Pierre Duez.,(2012). Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *Journal of Ethnopharmacology* 140 ,492– 512.

- Nilgün Goktürk Baydar., Hasan Baydar., (2012). Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. *Industrial Crops and Products* 41, 375– 380.
- Nelly Etienne-Selloum ., Israa Dandache.,Tanveer Sharif., Cyril Auger., Valérie B. Schini-Kerth .,(2013). Polyphenolic Compounds Targeting p53-Family Tumor Suppressors: Current Progress and Challenges.Croitie: Intech. 221p.
- Nasreen Najeeb D. Lilly., R. Syeda Ashfianaz., (2013). Antimutagenic Potential of Curcumin on Chromosomal Aberrations Induced by Sodium Azide in *Allium cepa* Root Tip Cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL SCIENCES*. Vol. 2 (1).
- Namita Khanna., Sonia Sharma., (2013). *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. *Indian J. Pharm. Biol. Res* Vol. 1 (3).
- O. Herrero., J.M. Pérez Martin., P. Fernandez Freire., L. Carvajal Lopez., A. Peropadre., M.J. Hazen., (2012). Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research* 743, 20– 24.
- O. Timothy., M. Idu, D.I. Olorunfemi., O. Ovuakporie-Uvo., (2013). Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. *South African Journal of Botany* 91,71–74.
- Pines J., Rieder CL., (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3: E3-6.
- P.C Winter., G.I.Hickey., H.L.Fletcher.,(2006). *L’essentiel en Génétique*. Paris: BERTI Editions. P108.

- Peter Firbas., Tomaž Amon., (2013). Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. Firbas and Amon, J Bioremed Biodeg vol 4.
- Robert J Nijveldt., Els van Nood., Danny EC van Hoorn., Petra G Boelens., Klaske van Norren., Paul AM van Leeuwen., (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr .,74:418–25.
- Roger Lacave., Christian-Jacques Larsen., Jacques Robert., (2005). Cancérologie fondamentale. Paris : John Libbey Eurotext. 19-22.
- Ravi R. Iyer., Anna Pluciennik., Vickers Burdett., Paul L. Modrich., (2006). DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. Chem. Rev, 106, 302-323.
- SSU-Ching Chen., King-Thom Chung., (1999). Mutagenicity and Antimutagenicity Studies of Tannic Acid and its Related Compounds. Food and Chemical Toxicology 38, 1-5.
- Stefan Irniger., (2002). Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. FEBS Letters 532, 7-11.
- Sebastian Tejs., (2008). The Ames test: a methodological short review. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY 4 (1), 7-14.
- Salim Khan., Fahad Al-Qurainy., Firoz Anwar., (2009). Sodium Azide: a Chemical Mutagen for Enhancement of Agronomic Traits of Crop Plants. Environ. We Int. J. Sci. Tech. 4, 1-21.
- Santosh Subhash Bhujbal., Rucha Prayagadas Deshmukh., Jayant Subhashchandra Bidkar., Vidya Amit Thatte., Shital Shivaji Awasare., Pratiksha Prahlad Garg.,(2011). Evaluation of cytotoxic activity of barks of *Mimusops elengi*. EurAsian Journal of BioSciences Eurasia J Biosci 5, 73-79.

- Sifa Türkoglu., (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103, 224–230.
- Selestin Rathnasamy., Kamaruzaman Bin Mohamed., Shaida Fariza Sulaiman., Akeem Akinboro., (2013). Evaluation of cytotoxic, mutagenic and antimutagenic potential of leaf extracts of three medicinal plants using *Allium cepa* chromosome assay. *International Current Pharmaceutical Journal*, 2(8): 131-140.
- Teixeira R.O., Camparoto M.L., Mantovani M.S., Vicentini V.E., (2003). Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. And *Achillea millefolium* L. in vivo assays. *Genetic Molecular Biology*, 26, 551-555.
- Tim Humphrey., Gavin Brooks., (2005). *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*. New Jersey: Humana Press.31-49.
- Tulay Askin Çelik., Ozlem Sultan Aslanturk.,(2010). Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf Extracts with *Allium* Test. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Wilfred Vermerris., Ralph Nicholson., (2006). *PHENOLIC COMPOUND BIOCHEMISTRY*. Netherlands: Springer.
- Wenjuan Liao., Michael A. McNutt., Wei-Guo Zhu., (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48, 46–53.

Résumé

Les plantes supérieures, tel que l'*Allium cepa*, sont un modèle intéressant pour les études de génotoxicité et d'antigenotoxicité. Dans cette étude quatre concentrations d'extraits ethanolique d'écorce d'*ulmus campestris* (50, 100, 300,400µg/ml) ont été testées pour évaluer leurs activités génotoxique, cytotoxique et leurs effet antigénotoxique contre les aberrations chromosomiques induites par le mutagène azide de sodium chez les racines d'*Allium cepa* pour 18h ,24h, 48h, 72h d'incubation à une température de 25°C. Les résultats observés suggèrent la cytotoxicité d'*ulmus campestris* à 400µg/ml suite a la diminution de l'indice mitotique par apport à celui du contrôle négatif, l'observation de la réduction du pourcentage d'aberrations chromosomiques chez les racines traitées avec la combinaison extrait et azide de sodium à 100µg/ml suggère la possession d'*Ulmus campestris* d'un potentiel antigénotoxique à cette concentration .

Mots clés : *ulmus campestris*, génotoxicité, antigénotoxique, azide de sodium, *Allium cepa* , cytotoxique.

Abstract

Higher plants, such as *Allium cepa*, is an interesting model for genotoxicity studies and antigenotoxicité . In this study four concentrations of ethanolic extracts of bark of *Ulmus campestris* (50, 100, 300.400 g / ml) were tested to evaluate their genotoxic activities and their cytotoxic effect against antigenotoxic chromosomal aberrations induced by the mutagen azide sodium in the roots of *Allium cepa* for 18h , 24h, 48h , 72h incubation at 25 ° C. the results observed suggest that *Ulmus campestris* may have a cytotoxic effect at 400µg/ml concentration after we observed a decrease in the mitotic index .We also tested the antigenotoxic effect of *Ulmus campestris* at 100µg/ml against the chromosomal aberration induced by sodium azide at 100µg/ml , the results showed a decrease of aberration rates which suggest the presence of an antigenotoxic potential in *Ulmus campestris* at this concentration.

Keywords: *ulmus campestris*, génotoxic, antigénotoxique, sodium azide , *Allium cepa* , cytotoxic.