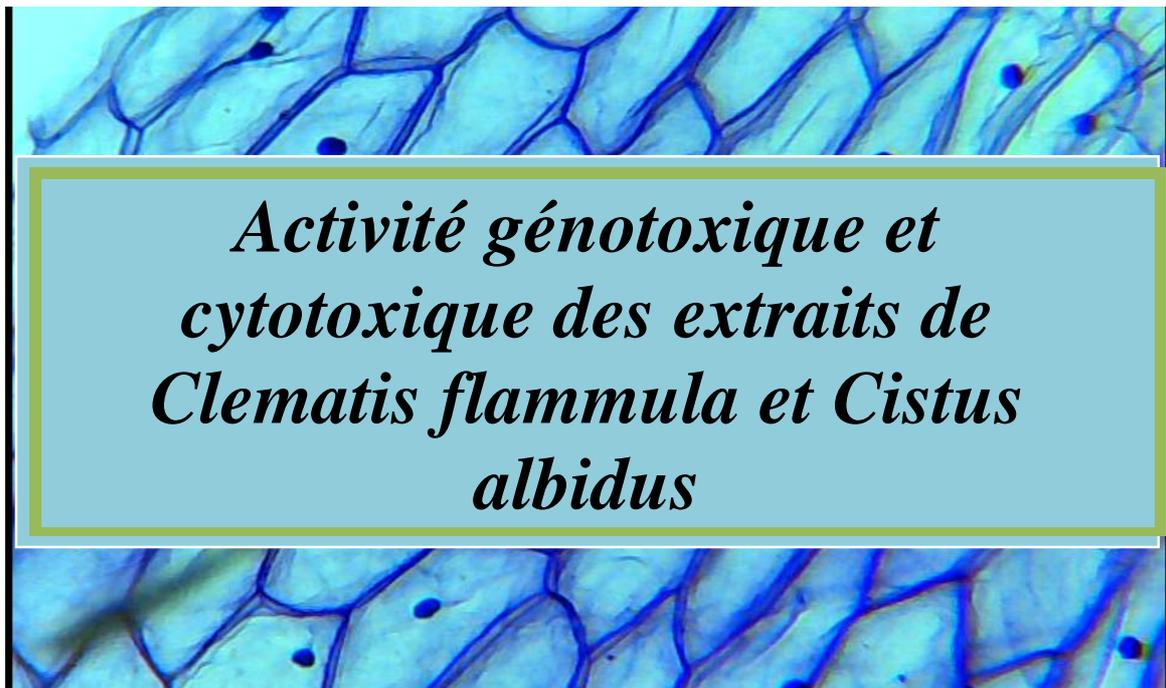


République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira. Béjaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimie

Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de  
Master

Option : Biochimie appliquée

Thème



**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> ALLOUCHE Kahina

M<sup>elle</sup> ATIK Nesrine

**Membres du jury :**

Président : M<sup>r</sup> Tacherfiout M. (M.A.A/U.A.M.B)

Examinatrice : M<sup>elle</sup> Cheraft N. (M.A.B/U.A.M.B)

Examinatrice : M<sup>elle</sup> Zemouri S. (M.A.B/U.A.M.B)

Promotrice : M<sup>elle</sup> Tahiri O. (M.A.A/U.A.M.B)

2013-2014

# Remerciements

**Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce travail.**

**On tient à remercier notre promotrice Melle Tahiri O. Pour avoir accepté de nous encadrer, pour son soutien, son dévouement, et surtout pour sa patience.**

**Nos vifs remerciements à :**

**Mme Debbache, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.**

**Melle Cherift et Melle Zemouri d'avoir accepté d'examiner ce travail.**

**Nos profonds remerciements vont également à Mme et Mr Atmani de nous avoir accepté au sein de leur laboratoire.**

**Nous tenons à remercier tout le personnel du laboratoire de génétique pour leur aide technique ainsi que pour leurs disponibilité et gentillesse.**

**Merci également à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici notre profonde reconnaissance.**

# Dédicaces

**Je dédie ce mémoire**

**A ma très chère mama Mila et à mon adorable papa Sacène**

**A ma sœur Lila et mon frère Khalef**

**A l'être cher Farid**

**A toute la famille Allouche**

**A ma grand-mère wardia**

**A Wassila et tata Samia**

**A mes tantes, oncles, cousins et cousines**

**A mes amies : Nesrine et Rebiha**

**Kahina**

# Dédicaces

**Je dédie ce mémoire**

**A l'âme de mon père qui est toujours présent dans mon cœur, je prie Dieu pour lui accorder son infinie miséricorde et l'accueille dans son éternel paradis. Que Dieu le bénisse**

**A ma très chère maman, à qui je dois ce que je suis**

**A mes deux frères Baziz et Dodoche**

**A toute ma famille**

**A mes adorables ami(e)s, Rahim, Kahina, Samantha, Laiza, Nassila, Sakima et Mounira**

**A ceux qui cherchent leurs noms ici, cette marque d'affection me va droit au cœur**

**Beaucoup de noms me sont venus à l'esprit en rédigeant ces lignes et la peur d'en oublier un, me pousse à cette écriture implicite**

**Nesrine**



**Liste des figures****Liste des tableaux****Glossaire****Abréviations****Introduction** ..... 1**Synthèse bibliographique**

I- 1 Le cycle cellulaire.....	2
I-1.1 Interphase.....	2
I-1.2 Mitose .....	3
I-2 Génotoxicité et agents génotoxiques .....	4
I-2.1 Agents chimiques .....	5
I-2.2 Agents physiques.....	5
I-2.3 Agents biologiques .....	5
I- 3 Composés phénoliques .....	6
I-3.1 Acides phénoliques.....	6
I-3.2 Flavonoïdes.....	7
I-2.3 Tanins .....	8
I-4 Propriétés anti-mutagènes des composés phénoliques .....	8
I-5 Propriétés mutagènes des composés phénoliques .....	9
I-6 Test de génotoxicité.....	9
I-6.1 Test de Ames .....	10
I-6.2 Test des adduits .....	11
I-6.3 Test des comètes.....	11
I-6.4 Test des micronoyaux.....	12
I-6.5 Test des aberrations chromosomiques.....	13
I-6.6 Tests de génotoxicité et cytotoxicité associés à <i>Allium cepa</i> .....	13
I-7 Présentation des plantes étudiées.....	15
I-7.1 Description botanique de <i>C. flammula</i> .....	15
I-7.2 Classification botanique de <i>C. flammula</i> .....	15
I-7.3 Effets thérapeutiques de <i>C. flammula</i> .....	15
I-7.4 Description botanique de <i>C. albidus</i> .....	16
I-7.5 Classification botanique de <i>C. albidus</i> .....	16

I-7.6 Effets thérapeutiques de <i>C. albidus</i> .....	16
I-7.7 Présentation et classification botanique de <i>Allium cepa</i> .....	17

### **Partie expérimentale**

II. Matériels et méthodes .....	18
II-1 Matériels de laboratoire et produits chimiques .....	18
II-2 Matériel végétal.....	18
II-3 Préparation du matériel végétal.....	18
II-3.1 Récolte et séchage .....	18
II-3.2 Broyage et tamisage .....	18
II-4 Etude de l'activité génotoxique et cytotoxique: test <i>Allium cepa</i> .....	19
II-4.1 Paramètres macroscopiques. ....	22
II-4.2 Paramètres microscopiques.....	22
II-5 Etude de l'activité anti-génotoxique et anti-cytotoxique .....	23
II-6 Analyse statistique.....	23

### **Résultats et discussion**

III- Résultats.....	24
III.1 Taux d'extraction .....	24
III-2 Paramètres macroscopiques .....	24
III-3 Résultats de l'étude des paramètres microscopiques .....	26
III-3.1 Effet cytotoxique.....	26
III-3.2 Effet anticytotoxique.....	26
III-3.3 Etude de l'effet génotoxique et antigénotoxique : Aberrations chromosomiques.....	30
Discussion .....	39
<b>Conclusion</b> .....	43
<b>Références bibliographiques</b> .....	44

### **Annexes**

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Schéma représentatif des phases de la division cellulaire.....	2
<b>Figure 2:</b> Structure chimique de base des flavonoïdes .....	7
<b>Figure 3:</b> Schéma du principe du test de Ames .....	11
<b>Figure 4:</b> Photographie de noyaux endommagés et d'un noyau non endommagé.....	12
<b>Figure 5:</b> Schéma de formation des micronoyaux.....	13
<b>Figure 6:</b> Photographie de <i>Clematis flammula</i> .....	15
<b>Figure 7:</b> Photographie de <i>Cistus albidus</i> .....	16
<b>Figure 8:</b> Photographie de la poudre des feuilles de <i>Cistus albidus</i> .....	18
<b>Figure 9:</b> Photographie d'une étape d'extraction éthanolique de <i>Cistus albidus</i> .....	19
<b>Figure 10:</b> Photographie des bulbes mis dans l'étuve .....	20
<b>Figure 11:</b> Photographie montrant l'aspect des racines de <i>Allium cepa</i> traités avec l'azide de sodium .....	24
<b>Figure 12:</b> Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> après traitement avec l'eau distillée, DMSO, l'azide de sodium et l'extrait <i>C. flammula</i> aux différentes concentrations.....	26
<b>Figure 13:</b> Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> après traitement avec l'eau, DMSO, l'azide de sodium et l'extrait <i>C. albidus</i> aux différentes concentrations.....	27
<b>Figure 14:</b> Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> après traitement avec l'eau, DMSO, l'azide de sodium et l'association extrait <i>C. flammula</i> à 100µg/ml / azide de sodium à 50µg/ml.....	28
<b>Figure 15</b> Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> après traitement avec l'eau, DMSO, l'azide de sodium et l'association extrait <i>C. albidus</i> à 100µg/ml/azide de sodium à 50µg/ml.....	29
<b>Figure 16:</b> Stades normales de la mitose dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> .	37
<b>Figure 17:</b> Stades perturbés de la mitose dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> traitées avec l'azide de sodium .....	37
<b>Figure 18:</b> Stades perturbés de la mitose dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> traitées avec <i>C. flammula</i> .....	38
<b>Figure 19:</b> Stades perturbés de la mitose dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> traitées avec <i>C. albidus</i> .....	38

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Structures chimiques de quelques acides phénoliques .....	7
<b>Tableau II:</b> Classification botanique de <i>C. flammula</i> .....	15
<b>Tableau III:</b> Classification botanique de <i>C. albidus</i> .....	16
<b>Tableau IV:</b> Classification botanique de <i>Allium cepa</i> .....	17
<b>Tableau V:</b> Composition chimique du milieu de culture de <i>Allium cepa</i> .....	20
<b>Tableau VI:</b> Les différents traitements utilisés .....	21
<b>Tableau VII:</b> Taux d'extraction de <i>C. flammula</i> et <i>C. albidus</i> .....	24
<b>Tableau VIII:</b> Différences en longueurs des racines de <i>Allium cepa</i> avant et après chaque traitement.....	25
<b>Tableau IX:</b> Pourcentages d'aberrations chromosomiques observées dans les cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> après les différents traitements.....	31
<b>Tableau X:</b> Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de <i>Allium cepa</i> traitées à 18h .....	33
<b>Tableau XI:</b> Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de <i>Allium cepa</i> traitées à 24h .....	34
<b>Tableau XII:</b> Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de <i>Allium cepa</i> traitées à 48h .....	35
<b>Tableau XIII:</b> Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de <i>Allium cepa</i> traitées à 72h .....	36



## Glossaire

**Acuminé** : Qui possède une extrémité allongée et pointue.

**Bipennée** : Se dit d'une feuille dont les folioles se partagent des deux côtés d'un axe.

**Caduque** : Arbre qui perd ses feuilles tous les ans à une période précise.

**Calice** : Ensemble des sépales d'une fleur.

**Capsule** : Fruit sec, syncarpe, s'ouvrant lorsqu'il est mûr pour libérer les graines.

**Carcinogène** : Agent capable de provoquer un cancer.

**Cunéiforme** : Se dit souvent pour désigner la base ou le sommet d'une feuille en forme de coin.

**Duveteux** : Recouvert de poils denses, courts et souples.

**Elliptique** : Se dit d'un organe en forme d'ellipse.

**Embrassant** : Qualificatif qui s'applique à un organe (souvent une feuille) dont la base entoure la tige plus ou moins complètement.

**Floraison** : Epanouissement des fleurs ; temps où cet épanouissement se produit.

**Lancéolée** : Se dit de tout organe végétal dont la forme rappelle celle d'un fer de lance.

**Loge** : Cavité d'un fruit qui contient les graines.

**Oblongue** : Qualifie un organe nettement plus long que large, aux bords quasiment parallèles.

**Ombelle** : Type d'inflorescence où tous les pédicelles partent d'un point unique et s'élèvent en divergeant pour former comme une sorte de parasol.

**Ovoïde** : Qualifie un organe dont le volume a la forme générale d'un œuf, inséré par son extrémité la plus large.

**Pédonculé :** Qui a un pédoncule (queue d'une fleur ou d'un fruit).

**Pétale :** Chacun des éléments foliacés, généralement colorés, qui composent la corolle d'une fleur.

**Pétiole :** Partie rétrécie située à la base de la feuille, qui lui sert de support et l'unit à la tige.

**Rameau :** Petite branche.

**Sépale :** Ensemble des folioles du calice d'une fleur.

**Sessile :** Se dit d'une fleur sans pédoncule, d'une feuille sans pétiole ou de tout autre organe dépourvu de pédicelle.

**Tronquée :** Désigne un organe (feuille) brusquement coupé transversalement au sommet de façon rectiligne.

## Liste des abréviations

**°C:** Degré celsius.

**µg:** Microgramme.

**µm:** Micromètre.

**A :** Adénine.

**AC :** Aberration chromosomique.

**ADN:** Acide désoxyribonucléique.

**BaP:** Benzo[a]pyrène.

**C:** Carbone.

**C :** Cytosine.

**CaSO<sub>4</sub>:** Sulfate de calcium.

**Cm:** Centimètre.

**Da:** Dalton.

**DMSO:** Diméthyl sulfoxyde.

**G :** Gap.

**g :** Gramme.

**G:** Grossissement.

**G :** Guanine.

**h:** Heure.

**His:** Histidine.

**IM:** Indice mitotique.

**KCl:** Chlorure de potassium.

**ml :** Millilitre.

**M :** Mitose.

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfate de magnésium.

**MM:** Milieu minéral.

**MN:** Micronoyau.

**N:** Normalité.

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonate de sodium.

**NaN<sub>3</sub>:** Azide de sodium.

**OMS:** Organisation mondiale de la santé.

**P :** Probabilité.

**S :** Synthèse.

**T :** Thymine.

**UV:** Ultraviolet.

**V:** Volume.

**V/V :** Rapport volume par volume.

## Introduction

---

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs (**Handa et al., 2008**). Selon l'OMS (2002), plus de 80% de la population mondiale a recours à la phytothérapie pour se soigner (**Zerbo et al., 2012**). Les métabolites secondaires des plantes, en particulier les composés phénoliques, font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro* (**Gonçalves et al., 2013**).

De nombreuses études montrent que les polyphénols jouent un important rôle dans la prévention des maladies dégénératives, du cancer et des maladies cardiovasculaires (**Edeas, 2010**). D'autres effets bénéfiques leurs sont également attribués tels que les effets anti-inflammatoire, antihépatotoxique, antibactérien, antiviral, antiallergique, antithrombique, antimutagène et antioxydant (**Karou et al., 2005 ; Xia et al., 2014**).

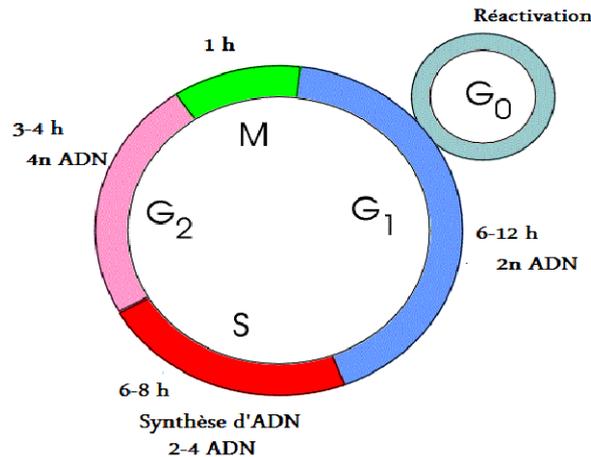
Malgré les avantages thérapeutiques que possèdent les plantes médicinales, certains composés contenus dans leurs extraits peuvent induire des mutations et entraîner un danger potentiel pour la santé (**Effraim et al., 2001 ; Teixeira et al., 2003 et Paes-Leme et al., 2005**). Il est donc extrêmement important d'utiliser des tests de génotoxicité qui viseront à évaluer la toxicité potentielle de ces composés (**Comparoto et al., 2002**).

Selon de nombreux auteurs, les végétaux supérieurs représentent d'excellents candidats pour évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des substances chimiques, en raison des similitudes des réponses de certains végétaux aux agents mutagènes à celles des animaux (**Cotelle, 1999**).

L'objectif principal de ce travail est l'estimation de l'activité génotoxique et cytotoxique des extraits éthanoliques de deux plantes médicinales, *Clematis flammula* et *Cistus albidus*. Cette étude a été effectuée sur *Allium cepa* à travers l'analyse des cellules méristématiques.

## I.1. le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire peut être défini comme un ensemble de modifications métaboliques interdépendantes, étroitement synchronisées, aboutissant à la duplication du génome et à la division cellulaire. Une séquence de quatre étapes dont la chronologie est représentée dans la figure 1 (Favaudon, 2000).



**Figure 1:** Schéma représentatif des phases de la division cellulaire (Charmot, 2006).

Les eucaryotes, de la levure à l'Homme, ont des cycles de division similaires (Viallard et al., 2001), ces étapes ont été définies par rapport aux événements majeurs de la vie de la cellule : la réplication de l'ADN et la division cellulaire (Ferbeyre, 2000).

Le cycle de division cellulaire consiste en la réplication du génome d'une cellule qui se divise ensuite en deux cellules filles, il se subdivise en deux étapes : l'interphase, où a lieu la réplication de l'ADN et la mitose, durant laquelle les chromosomes dupliqués sont séparés dans les deux cellules résultant de la division (Jorgensen et Tyers, 2004).

### I.1.1. Interphase

L'interphase est la phase primaire du cycle cellulaire, c'est l'intervalle entre deux mitoses successives (Klug et al., 2006). Elle représente environ 90% de la durée du cycle (Nabors, 2009). L'interphase se partage en trois phases : G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>. La phase G<sub>1</sub> est un intervalle pendant lequel les cellules se préparent à la synthèse d'ADN. En début de phase G<sub>1</sub>, des complexes pré-réplicatifs sont assemblés sur l'ADN aux endroits où se trouvent les

origines de réplication (**Diffley, 2004**). La phase S correspond à la phase de synthèse d'ADN, où une copie conforme du matériel génétique de la cellule est générée. La réplication s'initie sur de nombreuses origines conséquemment au recrutement de l'ADN polymérase par les complexes pré-réplicatifs formés en G1 (**Li et al., 2007**). La duplication des centrioles est un événement qui se produit parallèlement à la réplication de l'ADN. Les centrioles en association avec les protéines forment le centrosome qui est responsable de l'organisation du réseau de microtubules formé en mitose (**Fukasawa, 2007**).

La cellule doit répliquer la totalité de son ADN avant de progresser vers la phase suivante ; la phase G2. Vers la fin de la phase G2, les chromosomes commencent à se condenser et la cellule peut alors entrer dans la phase subséquente, à savoir la mitose (**Sancar et al., 2004**).

### **I.1.2. Mitose**

La mitose est le mécanisme de division qui permet à partir d'une cellule mère d'obtenir deux cellules filles identiques. Cette phase ne représente que 10% de la durée du cycle cellulaire. Elle comprend deux processus : la division du noyau et la division du cytoplasme, ce qui conduit à la répartition des nouveaux noyaux dans les deux cellules filles (**Nabors, 2009**).

La mitose est une période active subdivisée en quatre sous phases qui correspondent à des événements bien spécifiques (**Dey et al., 1997**).

#### **I.1.2.1. Prophase**

Le début de la prophase est caractérisé par l'individualisation des chromosomes, qui par la suite vont s'épaissir et se raccourcir ; chaque chromosome est constitué de deux chromatides sœurs soudées par leurs centromères. Les deux centromères accompagnés de microtubules constituent des asters qui vont migrer vers les deux pôles opposés de la cellule. Les microtubules exercent une tension sur les chromosomes et dirigent leurs mouvements pendant la division cellulaire. Ces microtubules et les protéines associées constituent le fuseau ou le filament. Les débris de l'enveloppe nucléaire ne sont plus visibles au microscope photonique (**Klug et al., 2010**).

A la fin de la prophase également appelée la pro-métaphase, les microtubules s'allongent en direction des centromères des chromosomes pour placer ces derniers à l'équateur du fuseau (**Delattre, 2006**).

### **I.1.2.2. Métaphase**

Tous les chromosomes sont bien orientés et alignés sur l'équateur du fuseau (plaque métaphasique) par leurs centromères (**Meijer, 2003**). Les microtubules attachés aux kinétochores sont responsables de ce mouvement (**Stansfield, 2003**).

### **I.1.2.3. Anaphase**

Les chromosomes se séparent et chaque chromatide, identique à son homologue, migre vers un pôle de la cellule et devient un chromosome à part entière (à une seule chromatide) (**Passarge, 2003**). Des protéines motrices entraînent les chromosomes vers les deux pôles opposés du fuseau. Les microtubules du fuseau attachés aux kinétochores continuent à se rétrécir, tandis que les autres microtubules s'allongent, éloignant les pôles du fuseau (**Nabors, 2009**).

### **I.1.2.4. Télophase**

Les chromosomes ont atteint les pôles du fuseau. Une structure microtubulaire se forme à mi-chemin entre les deux lots de chromosomes. Une constriction marque le site de la cytokinèse (**Meijer, 2003**). Inversement à la prophase, la télophase est la phase pendant laquelle la membrane nucléaire se reforme, les chromosomes se décondensent et le fuseau achromatique disparaît (**Petit et Julien, 2007**).

La cytotélerèse est l'événement le plus important qui se produit au niveau du cytoplasme, elle commence par une invagination de la membrane au centre de la cellule perpendiculairement à l'axe du fuseau pour former le sillon de division qui se creuse pour séparer les deux cellules filles (**Delattre, 2006**). Ensuite, de la cellulose et d'autres matériaux de consolidation sont ajoutés à la plaque cellulaire, la convertissant en une nouvelle paroi cellulaire (**Stansfield, 2003**).

## **I.2. Génotoxicité et agents génotoxiques**

La toxicologie génétique ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant avec l'ADN des cellules somatiques ou germinales capables de générer des lésions de l'ADN, qui en absence de réparation peuvent conduire à des mutations permanentes (**Berthelot-Ricou et al., 2013**).

Les agents génotoxiques peuvent interagir directement avec le matériel génétique et générer des adduits, des cassures de brins...etc, ou indirectement via leurs catabolites électrophiles formés par bioactivation, telles que les espèces réactives de l'oxygène génératrices de lésions oxydatives de l'ADN. Ils peuvent également se lier aux protéines

entraînant des dysfonctionnements enzymatiques qui peuvent générer des altérations de l'appareil mitotique ou de la machinerie de réplication (**Botta, 2006**).

Les agents génotoxiques sont divisés en trois différents groupes :

### **I.2.1. Agents chimiques**

Une grande variété de produits chimiques est en mesure de causer des mutations de l'ADN (**Winter et al., 2000**). Quatre groupes d'agents chimiques ont été distingués : les analogues de bases qui provoquent des délétions, des insertions ou des modifications d'une ou plusieurs bases de l'ADN, tels que le 5-bromo uracile ou la 2-amino purine (**Cachot, 2009**). Les agents intercalants tels que le bromure d'éthidium ou la proflavine qui sont des molécules à géométrie plane peuvent s'insérer entre les paires de bases entraînant ainsi une distorsion de l'ADN. Il existe aussi les agents désaminants qui génèrent des mutations ponctuelles mais également des mutations plus étendues et inactivantes tels que l'azide de sodium (**Le Blanc-Louvry et al., 2012**) et l'acide nitreux qui peuvent provoquer la désamination de la cytosine ou de l'adénine pour produire respectivement de l'uracile ou de l'hypoxanthine. Enfin, les agents alkylants capables d'entraîner des méthylations, éthylations ou alkylations au niveau des bases (**Cachot, 2009**).

### **I.2.2. Agents physiques**

Parmi les agents physiques mutagènes, il y'a les radiations ionisantes et les radiations non ionisantes (**Samouelian et al., 2009**).

Les radiations ionisantes hautement énergétiques, comme les rayons X ou gamma provoquent dans la molécule d'ADN des altérations étendues, des coupures dans les brins et la destruction des sucres et des bases (**Winter et al., 2000 ; Aftab et al., 2014**). Les radiations non ionisantes comme les rayons UV provoquent des transitions GC en AT (**Guiraud, 1993**).

### **I.2.3. Agents biologiques**

Certains agents biologiques comme les endoparasites, les virus, les plasmides, et les transposons peuvent s'insérer au niveau de l'ADN de la cellule hôte et interrompre la séquence génomique, par conséquent provoquer des mutations (**David, 2013**).

### **I.3. Composés phénoliques**

Les polyphénols sont les substances phytochimiques les plus largement étudiées et exploitées dans les différents domaines de recherche sur les plantes (**Boudet, 2007**) du fait de leurs multiples activités biologiques (**Falleh et al., 2008**). Ils sont largement distribués dans le règne végétal, et représentent les métabolites secondaires les plus retrouvés chez les plantes (**Robards 2003 ; Babar Ali et al., 2006 ; Naczk et Shahidi, 2004**).

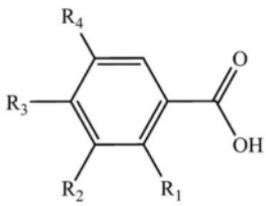
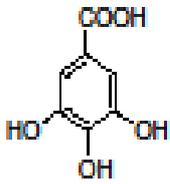
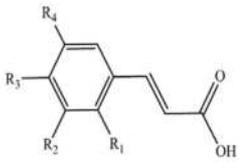
Les composés phénoliques comprennent un groupe de substances possédant un noyau aromatique ou plus, lié à un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Antolovich et al., 2000**). Leur structure va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire comme les acides phénoliques, jusqu'aux composés hautement polymérisés comme les tanins dont le poids moléculaire est supérieur à 30 000 Da (**Artajo et al., 2006**).

La plupart de ces composés ont une solubilité variable, selon leur degré de polarité et leur structure, comme le degré d'hydroxylation, de glycosylation ou d'acylation (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). Les polyphénols insolubles sont retrouvés dans la paroi cellulaire, alors que les polyphénols solubles se retrouvent à l'intérieur de la vacuole (**Naczk et Shahidi, 2006**). Les composés phénoliques sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient (**Boros et al., 2010**).

#### **I.3.1. Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont divisés en deux groupes principaux ; les acides hydroxbenzoïques qui sont dérivés de l'acide benzoïque, contenant sept atomes de carbone, et les hydroxycinnamiques qui sont dérivés de l'acide cinnamique qui comprend neuf atomes de carbone (Tableau N° I) (**Fraga, 2010 ; Skerget et al., 2005**).

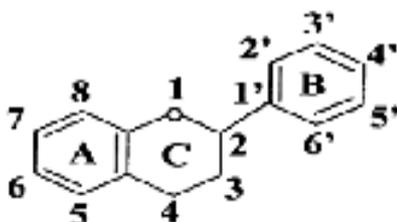
**Tableau I.** Structures chimiques de quelques acides phénoliques (**Balasundram et al., 2005**).

Acides phénoliques	Exemples	Structures
Dérivés de l'acide benzoïque 	Acide gallique	
Dérivés de l'acide cinnamique 	Acide caféique	

### I.3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la plus grande classe de polyphénols. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs, le pollen et les fruits. Leurs concentrations augmentent avec l'exposition au soleil et constituent de ce fait un écran protecteur contre la photo et la thermo dégradation (**Sarni-manchado et Cheynier, 2006**). Ce sont des composés à 15 atomes de carbone, qui ont tous une structure C6-C3-C6, deux noyaux benzéniques reliés entre eux par un groupe de 3 carbones (Figure 2). C'est l'arrangement de ce groupement C3 qui détermine la classification du composé (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Plus de 6500 flavonoïdes sont connus (**Rauha, 2001 ; D'Archivio et al., 2007**). Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 2', 3', 4', 5', (**Ullah et Khan, 2008**).

**Figure 2:** Structure chimique de base des flavonoïdes (**Heim et al, 2002**).

### I.3.3. Tannins

Les tanins sont des métabolites polyphénoliques qui ont la particularité de former des complexes avec les protéines (**Sharm et al., 1999**). Selon leur structure, les tanins existent sous deux formes : les tannins condensés et les tannins hydrolysables.

➤ **Tannins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables ont la caractéristique d'être dégradés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique (**Macheix et al., 2006**). Ce sont des molécules qui contiennent un hydrate de carbone (en général D-glucose) en tant que noyau central. Les groupes hydroxyles de ces hydrates de carbone sont estérifiés avec des groupements phénoliques, tels que l'acide ellagique ou acide gallique (**Min et Hart, 2003**). Les tanins hydrolysables sont classés en gallotannins et ellagitannins (**Ming-shu et al., 2006**).

➤ **Tanins condensés**

Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavaniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8. Les précurseurs de ces composés sont des flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et des flavane-3,4-diols (**wollgast et Anklam, 2000 ; Dykes et Rooney, 2006**).

#### **I.4. Propriétés anti-mutagènes des composés phénoliques**

Les polyphénols servent d'écrans contre les rayons ultraviolets (UV). Ils ont donc comme propriété de prévenir les mutations infligées par les radiations UV (**Escarpa et Gonzalez, 2001**). L'inhibition de la mutagénicité n'est pas basée sur un mécanisme spécifique. Les différents mécanismes d'activité antimutagène des composés phénoliques incluent une liaison directe de ces composés aux agents mutagènes, une inhibition des enzymes métaboliques et une action indirecte due à leur activité antioxydante (**Saraç et Şen, 2014 ; Nijveldt et al., 2001**).

Les polyphénols semblent fortement actifs contre l'effet mutagène du benzo [a] pyrène (BaP), cela est dû à l'inhibition de la famille des enzymes P-450, en particulier CYP1A1, la principale enzyme responsable de l'activation de BaP. En effet, les procarcinogènes comme le BaP nécessitent une activation par les enzymes du cytochrome P-450 afin de manifester leur activité mutagène / cancérogène (**Boubaker et al., 2010**). Les composés phénoliques génèrent des métabolites améliorant le système de réparation de l'ADN avant l'addition de l'agent mutagène BaP activé causant ainsi l'inhibition de sa mutagénicité. Les polyphénols, par conséquent, peuvent être des agents chimio-préventifs potentiels contre les mutagènes

environnementaux en empêchant leur bioactivation (par inhibition des enzymes métaboliques telles que CYP1A1), ou en renforçant les mécanismes de réparation de l'ADN par l'intermédiaire de composés actifs bioantimutagènes (**Lazarou et al., 2007**).

Shimoi et *al.* (1985) ont rapporté que l'acide tannique peut améliorer le système de réparation par excision par l'activation des enzymes de réparation ou en interagissant avec l'ADN. Ils ont également constaté que la gallocatéchine, l'épigallocatéchine gallate, et l'épigallocatéchine-3-gallate sont capables de réduire la formation des mutations.

### **I.5. Propriétés mutagènes des composés phénoliques**

Malgré les effets bénéfiques des composés phénoliques, plusieurs études indiquent leurs mutagénicité et génotoxicité chez les bactéries et mammifères. Ceci est dû à leur action pro-oxydant (génération des radicaux libres) ou à l'inhibition des enzymes associées à l'ADN telles que la topoïsomérase (**Skibola et Smith, 2000**).

Parmi les 66 flavonoïdes aglycones et les composés structurellement liés aux flavonoïdes testés, la quercétine est de loin le mutagène le plus fort (**Ferguson, 2000**). En effet, la quercétine est capable de provoquer des substitutions de paires de base, des décalages du cadre de lecture ainsi que des aberrations chromosomiques, des échanges de chromatides sœurs et de générer des micronoyaux (**Caria et al., 1995**). Il a également été rapporté que la quercétine et d'autres polyphénols peuvent se lier directement à l'ADN et cette interaction peut être à l'origine d'un important mécanisme de mutation bactérienne (**Ferguson, 2000**).

### **I.6. Tests de génotoxicité**

Plus de 200 tests utilisant des microorganismes, des insectes et des plantes ont été développés (**Waters et al., 1988**) pour permettre l'identification des agents causant les trois types de dommages génétiques responsables de pathologies humaines : les mutations géniques (modifications d'une ou de quelques paires de base dans un seul gène), les anomalies chromosomiques de structure (translocations et inversions consécutives à des cassures double-brins directes ou indirectes) et les mutations aneugènes (perte de chromosomes entiers) (**Dearfield et al., 2002**).

Les tests les plus fréquemment utilisés sont le test de Ames, la mesure des adduits à l'ADN, le test des comètes, le test des micronoyaux, et le test des aberrations chromosomiques. Parmi ces tests, il faut distinguer ceux qui permettent de mesurer le

potentiel génotoxique de ceux qui mesurent le pouvoir mutagène d'une substance (**Tarantini, 2009**), pour qu'un test soit valable, il doit satisfaire les conditions suivantes :

- Etre facile à réaliser et ne comporter aucun risque pour le sujet ;
- Fournir des résultats précis et reproductibles avec un minimum d'erreurs analytiques possibles ;
- Enfin, et surtout, l'information obtenue doit être quantitativement significative en termes de risques pour la santé d'un individu ou d'un groupe d'individus (**Vincent, 1993**).

### **I.6.1. Test de Ames**

Le test de Ames consiste à examiner si une substance chimique est capable d'induire des mutations chez une bactérie : *Salmonella typhimurium* (Figure 3) (**Pillière et Falcy, 1991**). Certaines substances nécessitent un inducteur pour être mutagène, pour cela un extrait de foie de rat appelé S9 Mix (fraction microsomale) obtenu par ultracentrifugation est souvent ajouté à l'agar avant étalement. Cet extrait enzymatique convertirait les substances cancérigènes en dérivés électrophiles, plus susceptibles de réagir directement avec l'ADN, système absent chez les bactéries mais présent chez les mammifères. Ainsi de nombreux agents cancérigènes comme les aflatoxines ne deviennent actifs dans ce test qu'en présence de cet extrait de foie (**Guy, 2014**). Les résultats peuvent être qualitatifs (absence ou présence de mutagénicité) ou quantitatifs (**Pillière et Falcy, 1991**).

Ce test est simple, rapide à réaliser et reproductible (**Pillière et Falcy, 1991**). Cependant, il présente un inconvénient majeur : il repose sur l'utilisation de cellules bactériennes dont le métabolisme diffère de celui des cellules animales et humaines (**Tarantini, 2009**).

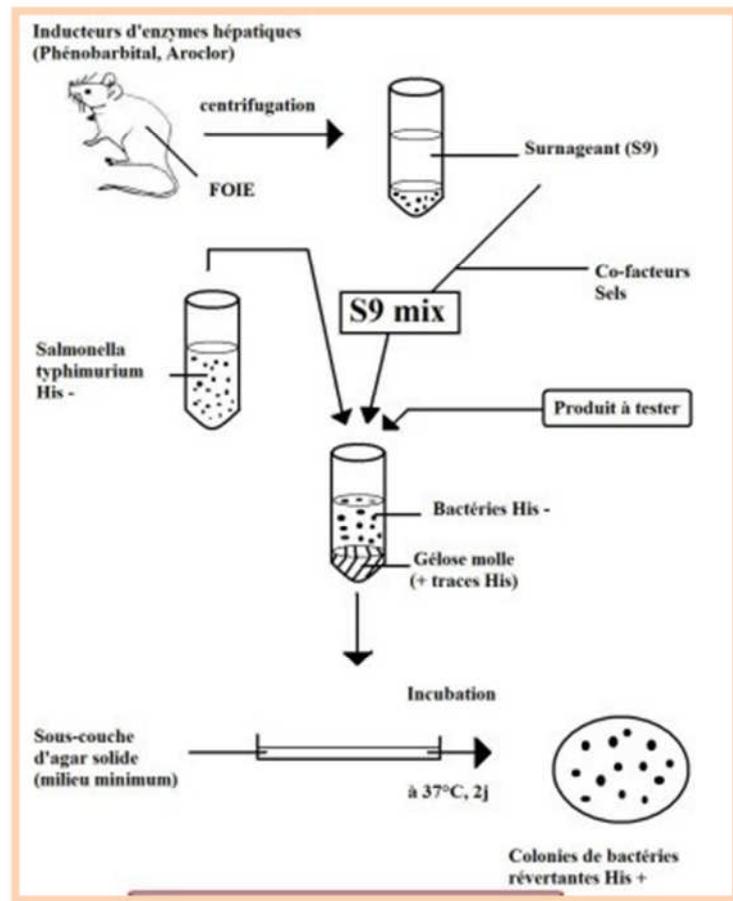


Figure 3: Schéma du principe du test de Ames (Sikora et al., 2012).

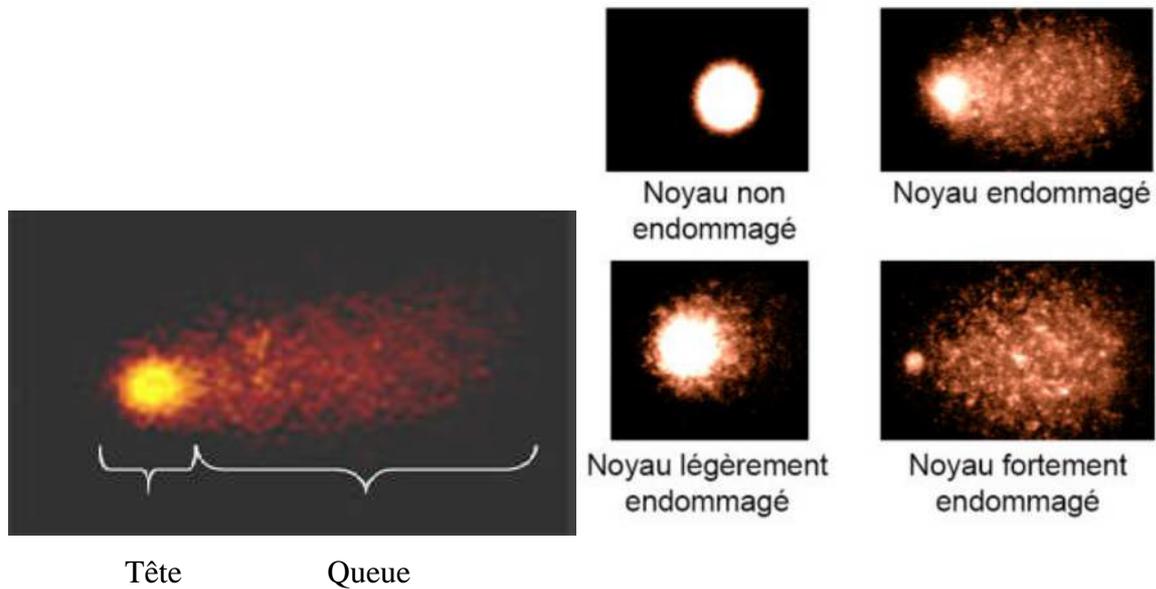
### I.6.2. Test des adduits

Certaines substances génotoxiques ont la propriété de se lier à certains sites moléculaires à l'intérieur de la cellule pour former des adduits. La technique des adduits permet de détecter ces liaisons aux macromolécules comme l'ADN (adduits à l'ADN) ou aux protéines (adduits aux protéines), lors de l'exposition de l'organisme à des agents génotoxiques (Pillière et Falcy, 1991).

### I.6.3. Test des comètes

Le test des comètes (Figure 4) permet de détecter et de mesurer des cassures simple et double brin au niveau de l'ADN ainsi que les sites abasiques instables en milieu alcalin et qui génèrent des cassures. Ce test possède l'avantage de pouvoir être appliqué sur n'importe quel type de cellule eucaryote exposée à un environnement génotoxique. Cette technique est simple, rapide, sensible et nécessite très peu de cellules. Par contre elle ne fournit qu'une

estimation qualitative du nombre de cassures. (Collins, 2004 ; Cotelle et Férard, 1999; Dixon *et al.*, 2002; Dhawan *et al.*, 2009).



**Figure 4** : Photographie de noyaux endommagés et d'un noyau non endommagé (Michel, 2011)

#### I.6.4. Test des micronoyaux

La formation de micronoyaux résulte de fragments de chromosomes qui ne sont pas présents dans le noyau fille au moment de la mitose (Schmid, 1975). L'absence de centromère due à des cassures (effet clastogène) ou à une désorganisation du noyau (effet aneugène) entraîne la formation de ces fragments de chromosomes (Figure 5). Trois critères sont à considérer : la taille du micronoyau, le contenu en ADN, et le pourcentage de micronoyaux ayant des bandes C positives (Vanparys *et al.*, 1990). Les bandes C correspondent à de l'ADN péri-centromérique et leur fréquence est augmentée en présence d'agents aneuploïdogènes (Van Hummelen *et al.*, 1992).

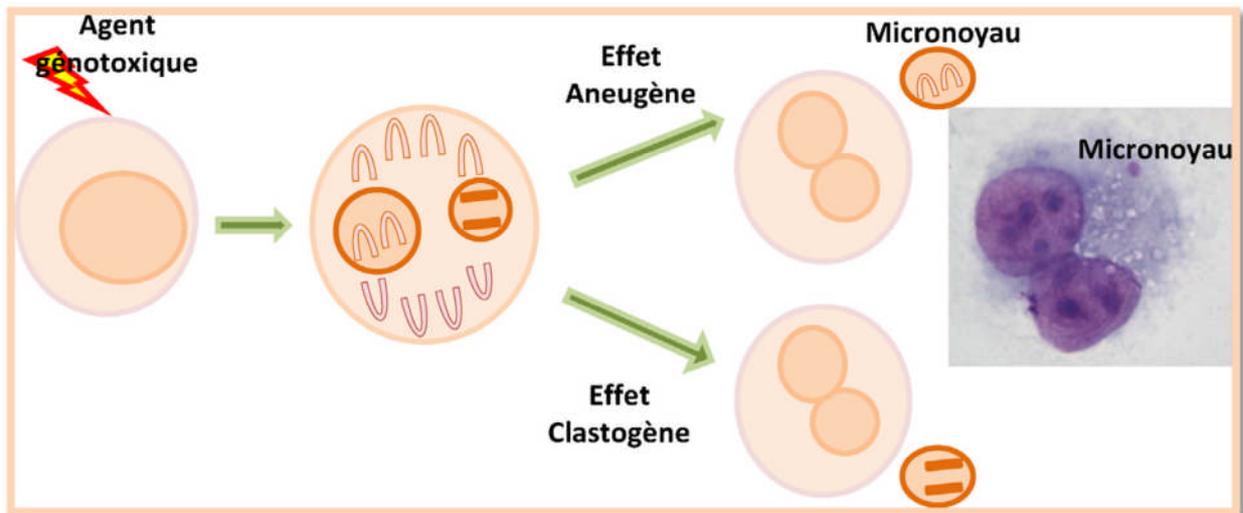


Figure 5 : Schéma de formation des micronoyaux (Berthelot-Ricou et al., 2013).

Ce test présente l'avantage de mettre en évidence à la fois les lésions aneugènes (anomalies du nombre de chromosomes) et les lésions clastogènes (Tarantini, 2009). C'est une technique simple qui utilise directement des cellules cibles de certains génotoxiques (Pillière et Falcy, 1991). Toutefois, ce test donne moins d'informations sur la nature des aberrations s'il n'est pas associé à d'autres tests (Parry et Sors, 1993).

#### I.6.5. Test des aberrations chromosomiques

Le test des aberrations chromosomiques consiste à examiner au microscope optique et à déceler des anomalies telles que les cassures de chromosomes, les modifications de structure et d'appariement et des erreurs survenues en cours de mitose (échanges entre chromatides sœurs...). Cet examen se fait au cours de la métaphase (Bonassi et al., 1995 ; Hagmar et al., 1998). Cette méthode est plus informative sur la nature des lésions que le test des micronoyaux. Cependant elle reste difficilement applicable (examens longs à réaliser) (Vincent, 1993).

#### I.6.6. Tests de génotoxicité et cytotoxicité associés à *Allium cepa*

*Allium cepa* permet l'évaluation de divers critères de cytotoxicité et de génotoxicité. Pour ce qui est de la cytotoxicité, l'élongation racinaire est très souvent déterminée en parallèle avec les études de génotoxicité (Fiskejo, 1988).

Les racines de *Allium cepa* ont surtout été utilisées pour déterminer le nombre d'aberrations chromosomiques. Cette espèce s'est avérée très sensible pour détecter le potentiel génotoxique de produits chimiques (Fiskesjo, 1997), métaux (Fiskesjo, 1988 ;

**Borboa et De la Torre, 1996**) produits phytosanitaires (**Butt et Vahidy, 1994**) ou autres substances organiques (**Cortés et al., 1985**).

D'autres critères ont aussi été étudiés dans les racines de *Allium cepa* : les échanges de chromatides sœurs (**Panda et al., 1996**) et très récemment, le test des comètes (**Navarrete et al., 1997**). Enfin, le test des micronoyaux évalué sur les racines de *Allium* est de plus en plus utilisé dans les études de génotoxicité (test *Allium*-MN) (**Rank et al., 2002**).

## I.7. Présentation des plantes étudiées

### I.7.1. Description botanique de *C. flammula*

Les clématites appartiennent à la famille des renonculacées (**Chawla et al., 2012**), *Clematis flammula* aussi appelée clématite flammette (**Marc et al., 2008**) est une plante vigoureuse à feuilles bipennées, caduques, ligneuses, légèrement poilues, épaisses de couleur verte, tige cylindrique, avec faibles côtes ovales à lancéolées, cunéiformes à tronquées à la base; pétiole glabre de 4 à 5cm de longueur; fleurs blanches odorantes avec 4 sépales en dessous (Figure N° 6) (**Quézel et Santa, 1962**). Les vaisseaux de la conduction de la sève brute sont de très gros calibre, traduisant des débits importants sur de grandes distances. Ces deux points suggèrent que cette herbacée est une plante grimpante, aux entre-nœuds particulièrement allongés (**Boutin et al., 2010**).



**Figure 6:** Photographie de *Clematis flammula* (Originale).

### I.7.2. Classification botanique de *C. flammula*

**Tableau II :** Classification de *C. flammula* (**Quézel et Santa, 1962**).

<b>Règne</b>	Plantae-Végétal
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Renunculales
<b>Famille</b>	Renunculaceae
<b>Genre</b>	<i>Clematis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Clematis flammula</i>

### I.7.3. Effets thérapeutiques de *C. flammula*

La clématite présente un important effet antioxydant et antibactérien (**Atmani et al., 2009**). Elle est utilisée dans le traitement de la sciatique (**Benkhiguel et al., 2011**), des

rhumatismes articulaires (Atmani et al., 2011), l'arthrite et les brûlures superficielles (Chawla et al., 2012).

#### I.7.4. Description botanique de *C. albidus*

*Cistus albidus*, plus couramment appelé Ciste blanc ou Ciste cotonneux, peu odorant, se trouve sous forme d'arbrisseau de 40 cm à 1 m de hauteur. Les feuilles d'un beau gris duveteux sont sessiles, demi embrassantes, oblongues elliptiques, opposées et très velues sur les 2 faces. Les fleurs de 4 à 6 cm de long, d'un rose lumineux sont pédonculées et en ombelle au sommet des rameaux. Les sépales, au nombre de 5, sont largement ovales, acuminés et velus. Les pétales, 2 à 3 fois plus longs que le calice, ont un aspect fripé (Figure N° 7). Le fruit quant à lui, se présente sous forme de capsule ovoïde à 5 loges, velu, plus court que le calice. *Cistus albidus* dont la période de floraison va de mai à juin, pousse sur les sols calcaires. On le trouve sur tout le pourtour méditerranéen: Sardaigne, Italie, Baléares, Espagne, Portugal et Algérie (Rameau et al., 2008).



Figure 7: Photographie de *Cistus albidus* (Calame, 2007).

#### I.7.5. Classification botanique de *C. albidus*

Tableau III : Classification de *C. albidus* (Guignard, 1998).

<b>Règne</b>	Plantae-Végétal
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe:</b>	Malvidees
<b>Ordre</b>	Malvales
<b>Famille</b>	Cistaceae
<b>Genre</b>	<i>Cistus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Cistus albidus</i>

#### I.7.6. Effets thérapeutiques de *C. albidus*

Toutes les espèces du genre *Cistus* sont fréquemment utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobiennes, antitumorales, antivirales (Dimas et al.,

2000) et anti-inflammatoires (Pala-Paul et al., 2005). Les feuilles, en décoction, sont utilisées contre les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant. En cataplasme, elles sont employées contre les abcès. Les feuilles sont utilisées en infusion dans du thé, comme digestif (Lahsissene et al., 2009).

#### I.7.7. Présentation et classification botanique de *Allium cepa*

*Allium cepa* fait partie de la famille des alliacées. Cette plante est cultivée dans de très nombreux pays pour son usage alimentaire (Grant, 1982).

**Tableau IV** : Classification botanique de *Allium cepa* (Breu, 1996).

<b>Règne</b>	Plantae-Végétal
<b>Embranchement</b>	Spermaphyte
<b>Classe</b>	Monocotylédone
<b>Ordre</b>	Lilliales
<b>Famille</b>	Alliaceae
<b>Genre</b>	<i>Allium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Allium cepa</i>

## II. Matériels et méthodes

Notre étude a pour objectif, d'une part, l'évaluation des potentiels génotoxique et cytotoxique des extraites éthanoliques de deux plantes médicinales *Clematis flammula* et *Cistus albidus*, et d'autre part la mise en évidence d'éventuels effets antigénotoxique et anticytotoxique, en utilisant le test *Allium cepa*.

### II.1. Matériels de laboratoire et produits chimiques

L'ensemble des réactifs et des équipements utilisés sont représentés dans l'annexe N°1.

### II.2. Matériel végétal

Les bulbes d'oignons ont été achetés au marché de la ville de Béjaia. Les feuilles de *Clematis flammula* ont été récoltées en juin-juillet 2012 dans la région d'Amizour (Béjaia) et les feuilles de *Cistus albidus* ont été récoltées en août 2013 dans la région de Tazmalt (Béjaia).

### II.3. Préparation du matériel végétal

#### II.3.1. Récolte et séchage

Les échantillons sont nettoyés afin d'éliminer toute particule étrangère et les tiges sont ensuite enlevées. Les feuilles de la plante nettoyées sont mises dans une étuve à 30°C.

#### II.3.2. Broyage et tamisage

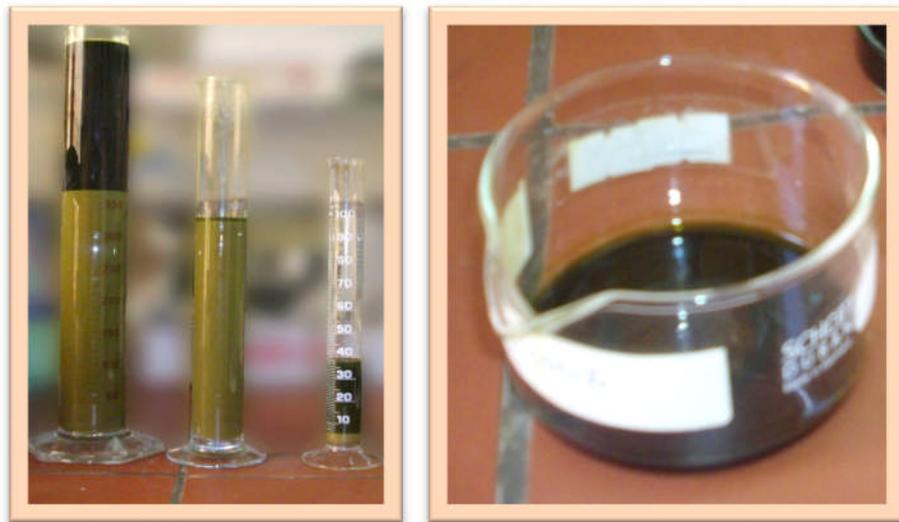
Après le séchage, les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisés afin d'obtenir une poudre fine à particule de granulométrie homogène inférieure ou équivalente à 63  $\mu\text{m}$  (Figure N° 8) qui permet l'extraction de taux importants de composés phytochimiques, doués de toutes leurs activités biologiques. La poudre de chaque échantillon est conservée dans des bocaux, bien hermétiques et recouverts.



**Figure 8:** Photographie de la poudre des feuilles de *Cistus albidus* (Originale).

### ➤ Extraction

Les polyphénols sont extraits selon la méthode décrite par Atmani et *al.*, (2011). Les extraits éthanoliques des deux plantes sont obtenus par macération de la poudre végétale dans l'éthanol absolu avec un rapport masse/volume de (1/4) pendant 24h sous agitation. Le mélange est versé dans une éprouvette et laissé décanter pendant 24h. Le surnageant est récupéré puis versé dans des cristallisoirs et soumis à un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière jusqu'à stabilisation complète de son poids (Figure N° 9).



**Figure 9:** Photographie d'une étape d'extraction éthanolique de *Cistus albidus* (originale).

### ➤ Rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction est déterminé comme suit :

$$\% \text{ d'extraction} = [(P_1 - P_0) / m] \times 100$$

P0 : Poids du cristallisoir vide (g).

P1 : Poids du cristallisoir et l'extrait après évaporation du solvant d'extraction(g).

m: Poids de la poudre en gramme.

#### II.4. Etude de l'activité génotoxique et cytotoxique : test *Allium cepa*

Pour mettre en évidence un éventuel effet génotoxique et cytotoxique des extraits éthanoliques des feuilles de *C. flammula* et *C. albidus*, nous avons retenu le test *Allium cepa*. Ce test a été choisi pour son efficacité, sa simplicité, et pour son coût moins onéreux (Fiskesjo, 1987).

➤ **Protocole**

Des bulbes d'oignons de taille homogène sont préparés en les lavant et en les épluchant, par la suite les bulbes sont mis dans des flacons remplis de milieu de culture, ce dernier est renouvelé toutes les 24h pour permettre le développement des racines jusqu'à environ 2cm de longueur, les bases des bulbes sont mises en contact direct avec le milieu liquide dont la composition figure dans le tableau N° V. Les échantillons ainsi préparés sont mis dans l'étuve à une température de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Figure N° 10).



**Figure 10:** Photographie des bulbes mis dans l'étuve (originale).

**Tableau V :** Composition chimique du milieu de culture de *Allium cepa*.

Composé	Concentration mg/l
$\text{CaSO}_4$	60
$\text{MgSO}_4$	60
$\text{NaHCO}_3$	96
$\text{KCl}$	4

Nous avons utilisé des lots de 6 bulbes, répartis dans le tableau suivant (Tableau N° VI) :

**Tableau VI** : Les différents traitements utilisés.

Numéro de lot	Traitement
1	MM + eau distillé
2	MM + DMSO
3	MM + NaN <sub>3</sub> à 25 µg/ml
4	MM + NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml
5	MM + NaN <sub>3</sub> à 100 µg/ml
6	MM + extrait de <i>C.flammula</i> à 50 µg/ml
7	MM + extrait de <i>C.flammula</i> à 100 µg/ml
8	MM + extrait de <i>C.flammula</i> à 300 µg/ml
9	MM + extrait de <i>C.albidus</i> à 50 µg/ml
10	MM + extrait de <i>C.albidus</i> à 100 µg/ml
11	MM + extrait de <i>C.albidus</i> à 300 µg/ml

MM : Milieu Minéral ; NaN<sub>3</sub> : Azide de sodium

Les bulbes ainsi traités sont remis à l'étuve pour une durée de 18 heures, 24 heures, 48 heures et 72heures.

#### ➤ Fixation

Les racines sont nettoyées à l'eau distillée et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés pendant une durée de 18h dans un mélange éthanol absolu et acide acétique à 45% avec un rapport de (3/1) (V/V) préparé extemporanément (**kanaya et al., 1994**). Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans de l'éthanol 70% pour

une observation différée ou bien être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate (Ma *et al.*, 1995).

➤ **Hydrolyse acide**

Après la fixation, les extrémités racinaires sont alors rincées avec de l'eau distillée, puis hydrolysées avec du HCl 1N au bain marie à 60°C pendant 10 minutes. L'hydrolyse a pour but la destruction de la lamelle moyenne composée principalement de pectine, ce qui facilite les étalements cellulaires (Ma *et al.*, 1995).

➤ **Coloration**

Les racines hydrolysées sont colorées à base de carmin acétique à 2%, puis incubées au bain marie à 60°C pendant 10 minutes, il s'agit ensuite de poser une extrémité racinaire sur une lame, de couper les deux premiers millimètres de la partie méristématique et les écraser à l'aide d'une lamelle. La préparation est observée au microscope photonique au grossissement Gx40 puis Gx100 (Bakare *et al.*, 2012).

La mise en évidence d'éventuels effets génotoxiques et cytotoxiques s'est faite par l'évaluation de deux paramètres.

#### **II.4.1. Paramètres macroscopiques**

C'est l'observation morphologique des racines à l'œil nu après chaque traitement. Les signes de toxicité recherchés sont les changements de la consistance, la forme, la couleur des racines, et la croissance de la longueur des racines mesurée à l'aide d'un pied à coulisse (Mirjana *et al.*, 2000 ; Herrero, 2012).

#### **II.4.2. Paramètres microscopiques**

L'analyse microscopique consiste à dénombrer les cellules en interphase, prophase, métaphase, anaphase et télophase, sur un nombre d'environ 1000 cellules de la zone méristématique, pour chaque bulbe d'oignon. Ensuite on procède à la détermination de l'indice mitotique de phase ainsi que les aberrations chromosomiques (Herrero, 2012).

➤ **Indice mitotique**

L'indice mitotique est défini par Kumari (2011) comme étant le nombre total des cellules en division sur environ 1000 cellules dénombrées. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{IM}\% = [(P+M+A+T) / (I+P+M+A+T)] \times 100$$

**IM:** Indice mitotique; **P:** Prophase; **M:** Métaphase; **A:** Anaphase; **T:** Télophase; **I:** Interphase.

➤ **Indice mitotique de phase**

L'indice mitotique de chaque phase est calculé par la division du nombre de cellules de la phase donnée par le nombre total de cellules en division (Kumari et al., 2009).

$$\text{IM}\% = (\text{nombre de cellule en phase donnée} / \text{nombre total de cellule en division}) \times 100$$

➤ **Aberration chromosomique**

Le nombre des cellules aberrantes est noté par rapport à la totalité des cellules calculées. Les aberrations sont caractérisées par d'éventuels ponts (bridges), des cassures de chromosomes, des agglomérats, des micronoyaux, d'isolement d'un ou plusieurs chromosomes et des C-mitoses (Bakare et al., 2000).

## II.5. Etude de l'activité anti-génotoxique et anti-cytotoxique

Pour évaluer un éventuel effet anti-génotoxique et anti-cytotoxique, nous avons traité les lots de bulbes avec des mélanges de l'extrait de chaque plante à une concentration de 100µg/ml avec l'azide de sodium à une concentration de 50µg/ml. Ce travail est réalisé dans les mêmes conditions que l'étude de l'activité génotoxique.

## II.6. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont la moyenne ± SEM (n=6), les résultats ont été traités par une analyse One-way ANOVA à l'aide du logiciel GRAPHPAD version 6. La comparaison des moyennes des traitements est réalisée à l'aide du test Tukey, les différences sont considérées significatives à p<0,05.

### III. Résultats

#### III.1. Taux d'extraction

Le tableau N° VII représente le taux d'extraction éthanolique des deux plantes étudiées.

**Tableau VII :** Taux d'extraction de *C. flammula* et *C. albidus*.

Extrait éthanolique	Taux d'extraction
<i>Clematis flammula</i>	11,30%
<i>Cistus albidus</i>	16,40%

#### III.2. Paramètres macroscopiques

L'observation morphologique à l'œil nu des racines des bulbes incubées dans l'eau distillée et celles traitées avec le DMSO, l'azide à 25µg/ml et 50µg/ml, les extraits : *C. albidus* à 50µg/ml et 100µg/ml, *C. flammula* à 50µg/ml et à 100µg/ml ne montrent aucune anomalie, ces racines présentent une croissance normale. Néanmoins, les signes de toxicité sont apparus lors des traitements des racines par l'azide de sodium à 100µg/ml, les extraits de *C. albidus* et *C. flammula* à 300µg/ml, ainsi que l'association azide de sodium à 50µg/ml avec les deux extraits de plante à 100µg/ml.

Les différents caractères morphologiques observés sont : le changement de la couleur, de la forme, du nombre, de la consistance (Figure N°11) et de la longueur des racines (Tableau N° VIII).



**Figure 11:** Photographie montrant l'aspect des racines de *Allium cepa* traitées avec l'azide de sodium (Originale)

**Tableau VIII:** Différences en longueurs des racines de *Allium cepa* avant et après chaque traitement.

Traitement	$\Delta L$ (cm) 18h	$\Delta L$ (cm) 24h	$\Delta L$ (cm) 48h	$\Delta L$ (cm) 72h
Eau	2.16±0.07 <sup>a</sup>	1.48±0.06	2.58±0.11	3.70±0.18
DMSO	1.95±0.14 <sup>bcd</sup>	2.23±0.14	4.26±0.16	4.03±0.21
NaN <sub>3</sub> à 25 µg/ml	0.72±0.08 <sup>e</sup>	0.87±0.10	0.53±0.08	0.69±0.07
NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml	0.81±0.06 <sup>e</sup>	1.26±0.03	0.82±0.06	1.25±0.14
NaN <sub>3</sub> à 100 µg/ml	0.58±0.03	0.11±0.08	1.11±0.07	0.25±0.05
<i>C.flammula</i> à 50 µg/ml	2.13±0.03 <sup>af</sup>	2.87±0.05	2.52±0.43 <sup>a</sup>	2.46±0.05 <sup>a</sup>
<i>C.flammula</i> à 100 µg/ml	1.85±0.06 <sup>bg</sup>	1.78±0.05	3.06±0.08	2.43±0.06 <sup>a</sup>
<i>C.flammula</i> à 300 µg/ml	-0.08±0.02 <sup>h</sup>	-0.25±0.02 <sup>bc</sup>	-0.37±0.03 <sup>bc</sup>	-0.1±0.03 <sup>b</sup>
<i>C.albidus</i> à 50 µg/ml	2.03±0.04 <sup>cf</sup>	2.03±0.03	2.08±0.04 <sup>e</sup>	1.88±0.02 <sup>d</sup>
<i>C.albidus</i> à 100 µg/ml	1.85±0.04 <sup>dg</sup>	2.16±0.06 <sup>a</sup>	1.83±0.02 <sup>e</sup>	2.05±0.02 <sup>d</sup>
<i>C.albidus</i> à 300 µg/ml	-0.21±0.02 <sup>i</sup>	-0.13±0.01 <sup>b</sup>	-0.15±0.01 <sup>cdf</sup>	0.05±0.01 <sup>b</sup>
NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml + extrait de <i>C.flammula</i> à 100 µg/ml	-0.43±0.02	-0.43±0.02 <sup>d</sup>	-0.35±0.01 <sup>bd</sup>	-0.35±0.01 <sup>c</sup>
NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml + extrait de <i>C.albidus</i> à 100 µg/ml	-0.13±0.01 <sup>hi</sup>	-0.37±0.01 <sup>cd</sup>	0.03±0.02 <sup>f</sup>	-0.43±0.01 <sup>c</sup>

-NaN<sub>3</sub> : Azide de sodium

-  $\Delta L$  : moyenne des différences de longueur (cm) des racines de *Allium cepa* avant et après traitement ± SEM (n=6)

-Les valeurs de  $\Delta L$  qui ont une même lettre ne diffèrent pas significativement au risque P<0,05.

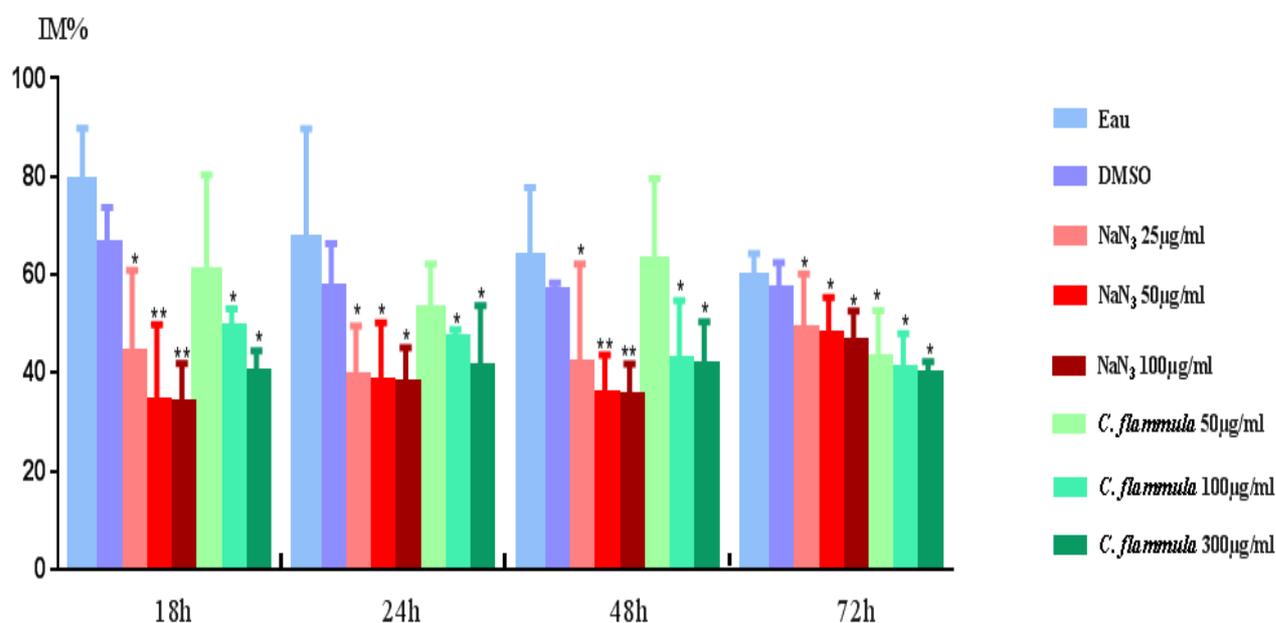
L'analyse des résultats du tableau N° VIII à différentes heures montre que la croissance en longueur des racines de *Allium cepa* ne diffère pas significativement (P<0,05) entre les lots traités avec les extraits de *C. flammula* et *C. albidus* aux concentrations 50µg/ml et 100µg/ml avec les lots traités avec l'eau distillée et le DMSO. Par contre, le traitement avec une concentration de 300µg/ml des extraits des deux plantes provoque une inhibition

significative ( $P < 0,05$ ) de la croissance des racines par rapport aux contrôles négatifs et positifs.

Nous remarquons aussi que le traitement à 18h, 24h, 48h, 72h des bulbes avec les extraits de *C. flammula* et *C. albidus* à  $100\mu\text{g/ml}$  associés à l'azide de sodium à  $50\mu\text{g/ml}$  provoque une réduction importante de la croissance en longueur des racines comparativement aux contrôles positifs et négatifs.

### III. 3. Résultats de l'étude des paramètres microscopiques

#### III. 3. 1. Effet cytotoxique



**Figure 12 :** Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* après traitement avec l'eau distillée, DMSO, l'azide de sodium et l'extrait *C. flammula* aux différentes concentrations.

Les résultats sont : les moyennes  $\pm$  SEM (n=6). Les différences sont significatives à  $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$ . NaN<sub>3</sub>: azide de sodium ; IM : indice mitotique

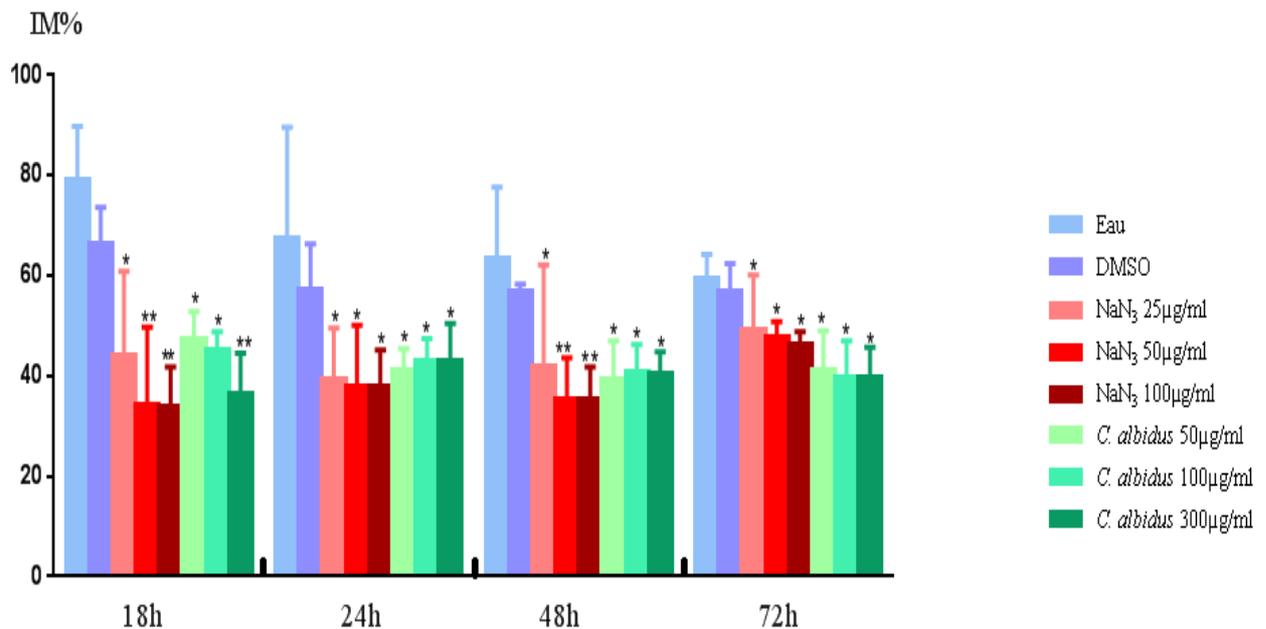
D'après nos constatations, la figure N° 12 montre qu'après 18h, 24h, 48h, et 72h, il n'y a pas de différence significative ( $p < 0,05$ ) de l'indice mitotique (IM) entre les cellules traitées avec l'eau distillée et les cellules traitées avec le DMSO.

Pour le contrôle positif, nous remarquons que l'azide de sodium induit une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de l'IM comparativement aux contrôles négatifs.

Comme le montre la figure N° 12, l'extrait éthanolique de *C.flammula* à 50µg/ml provoque entre 18 et 48h une augmentation significative de l'IM par rapport aux contrôles positifs.

Nous remarquons également que le traitement des cellules méristématiques de *Allium cepa* par l'extrait éthanolique de *C. flammula* 100µg/ml et 300µg/ml provoque une diminution significative ( $p<0,05$ ) de l'IM par rapport aux contrôles négatifs, et ne présente pas de différence significative par rapport aux contrôles positifs à 24h et 72h.

Toutefois, à 18h et 48h, l'IM des cellules traitées avec 100 et 300µg/ml d'extrait éthanolique de *C.flammula* est significativement supérieur de celui des cellules traitées avec 50 et 100µg/ml d'azide de sodium.



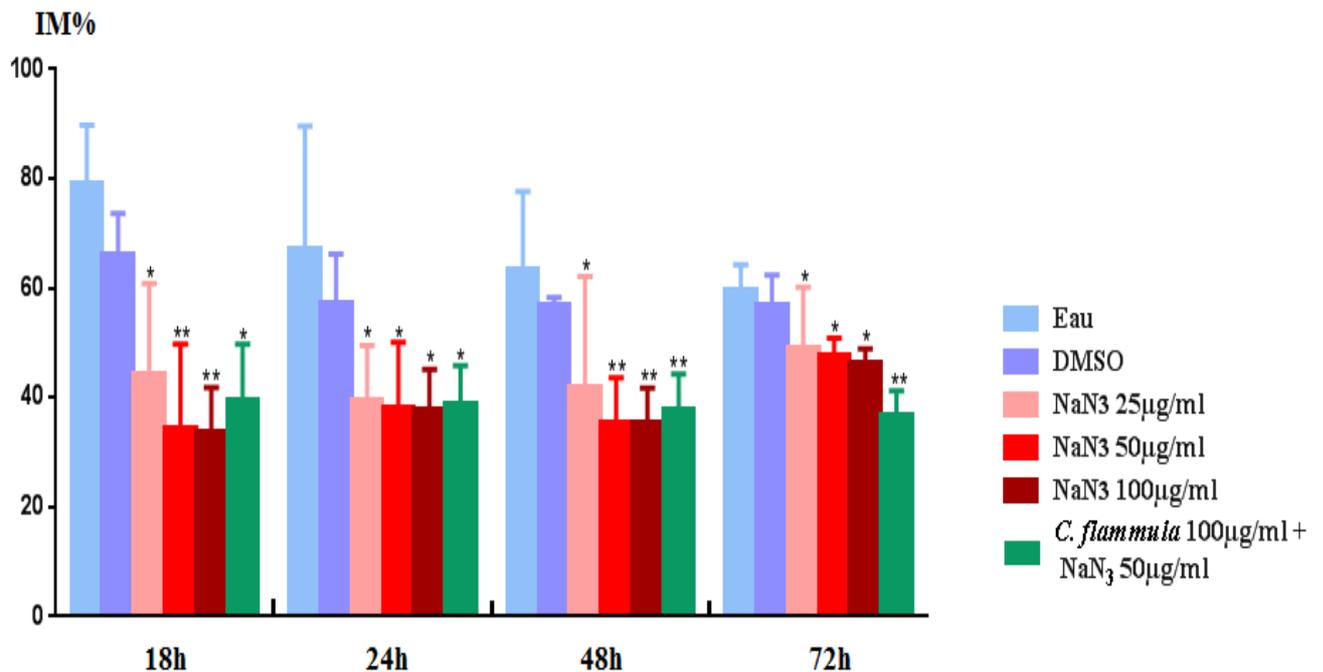
**Figure 13 :** Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* après traitement avec l'eau, DMSO, l'azide de sodium et l'extrait *C. albidus* aux différentes concentrations.

Les résultats sont : les moyennes  $\pm$  SEM (n=6). Les différences sont significatives à  $p^*<0,05$ ;  $p^{**}<0,01$ . .NaN<sub>3</sub> : azide de sodium ; IM : indice mitotique.

D'après la figure N° 13, l'IM des cellules traitées avec les différentes concentrations d'extrait de *C. albidus* reste significativement inférieure ( $p<0,05$ ) à l'IM des cellules des lots témoins négatifs.

La comparaison avec les lots témoins positifs montre que l'IM des cellules des lots traités avec 50µg/ml et 100µg/ml d'extrait est similaire à celui observé après traitement avec l'azide de sodium à 25µg/ml et ceux après 18h, 24h, 48h, 72h d'exposition. L'IM observé avec l'extrait à 300µg/ml à 18h de traitement est similaire à l'IM obtenu avec l'azide de sodium à 50µg/ml et 100µg/ml.

### III.3.2. Effet anticytotoxique

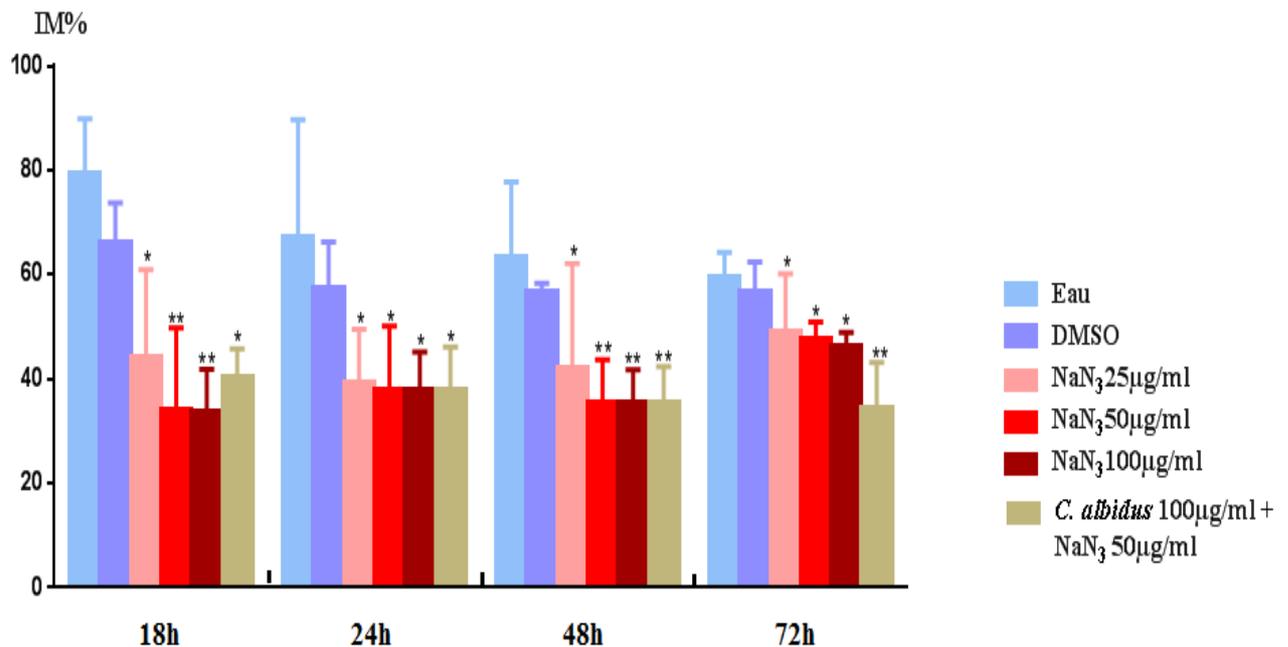


**Figure 14:** Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* après traitement avec l'eau, DMSO, l'azide de sodium et l'association extrait *C. flammula* à 100µg/ml / azide de sodium à 50µg/ml.

Les résultats sont : les moyennes ± SEM (n=6). Les différences sont significatives à  $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$ . NaN<sub>3</sub>: azide de sodium ; IM : indice mitotique.

Comme on peut le constater sur la figure N° 14, le traitement combiné azide de sodium/*C. flammula* provoque une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de l'IM par rapport aux contrôles négatifs. Cette réduction devient très significative ( $p < 0,01$ ) à 48h et 72h.

Nous remarquons également que l'IM observé dans les lots traités avec l'association azide de sodium (50µg/ml) et l'extrait de *C. flammula* (100µg/ml) est similaire à celui observé après traitement avec l'azide de sodium à 50 et 100µg/ml à 24h et 48h, le traitement prolongé (72h) avec ce mélange s'avère plus inhibiteur de la division cellulaire, l'IM obtenu est très significativement inférieur ( $p<0,01$ ) à celui obtenu avec l'azide de sodium à 50µg/ml.



**Figure 15:** Indices mitotiques observés dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* après traitement avec l'eau, DMSO, l'azide de sodium et l'association extrait *C. albidus* à 100µg/ml/azide de sodium à 50µg/ml.

Les résultats sont : les moyennes  $\pm$  SEM (n=6). Les différences sont significatives à  $p^*<0,05$ ;  $p^{**}<0,01$ . NaN<sub>3</sub>: azide de sodium ; IM : indice mitotique.

Comme on peut le constater sur la figure N°15, le traitement avec l'association azide de sodium/*C. albidus* réduit de façon significative ( $p<0,05$ ) l'IM comparativement aux contrôles négatifs, cette réduction devient très significative ( $p<0,01$ ) à 48h et 72h d'exposition.

La comparaison avec le contrôle positif à 50 et 100µg/ml, montre que l'effet de cette association est similaire à 24h et 48h, l'association devient plus cytotoxique après 72h, en

effet l'IM observé dans les lots traités avec ce mélange est très significativement ( $p < 0,01$ ) réduit par rapport à celui observé dans le lot traité avec l'azide de sodium à 50 et 100 $\mu$ g/ml.

### **III. 3. 3. Etude de l'effet génotoxique et antigénotoxique : Aberrations chromosomiques**

Le tableau IX rapporte les valeurs du pourcentage des aberrations chromosomiques observées dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* après différents traitements.

**Tableau IX:** Pourcentages d'aberrations chromosomiques observées dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* après les différents traitements.

Traitement	AC% 18h	AC% 24h	AC% 48h	AC% 72h
<b>Eau</b>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<b>DMSO</b>	0.09±0.07 <sup>a</sup>	0.36±0.34 <sup>a</sup>	0.16±0.13 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>
<b>NaN<sub>3</sub> 25 µg/ml</b>	0.23±0.15 <sup>a</sup>	0.09±0.08 <sup>ab</sup>	0.39±0.31 <sup>a</sup>	0.06±0.04 <sup>a</sup>
<b>NaN<sub>3</sub> 50 µg/ml</b>	3.08±1.09 <sup>b</sup>	0.97±0.36 <sup>ac</sup>	1.51±0.63 <sup>b</sup>	0.30±0.15 <sup>ab</sup>
<b>NaN<sub>3</sub> 100 µg/ml</b>	7.35±2.61	4.49±1.76 <sup>d</sup>	1.21±0.61 <sup>b</sup>	2.16±0.50
<b><i>C.flammula</i> 50 µg/ml</b>	0.32±0.10 <sup>a</sup>	2.78±1.09 <sup>ef</sup>	1.93±0.51 <sup>c</sup>	0.76±0.44 <sup>b</sup>
<b><i>C.flammula</i> 100 µg/ml</b>	2.58±0.51 <sup>b</sup>	3.64±0.83 <sup>de</sup>	1.89±0.43 <sup>bc</sup>	0.55±0.36 <sup>a</sup>
<b><i>C.flammula</i> 300 µg/ml</b>	2±0.69 <sup>bc</sup>	1.39±0.50 <sup>bcgh</sup>	2.10±0.38 <sup>c</sup>	1.35±0.66 <sup>c</sup>
<b><i>C.albidus</i> 50 µg/ml</b>	0.52±0.14 <sup>a</sup>	0.93±0.42 <sup>abi</sup>	0.36±0.12 <sup>a</sup>	0.57±0.21 <sup>ab</sup>
<b><i>C.albidus</i> 100 µg/ml</b>	0.32±0.23 <sup>a</sup>	0.39±0.13 <sup>ag</sup>	0.56±0.20 <sup>a</sup>	0.57±0.16 <sup>ab</sup>
<b><i>C.albidus</i> 300 µg/ml</b>	0.17±0.09 <sup>a</sup>	0.38±0.09 <sup>ag</sup>	0.21±0.09 <sup>a</sup>	0.36±0.12 <sup>ab</sup>
<b>NaN<sub>3</sub> 50 µg/ml + extrait de <i>C.flammula</i> 100 µg/ml</b>	0.78±0.42 <sup>a</sup>	1.85±0.75 <sup>cfij</sup>	0.05±0.03 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>
<b>NaN<sub>3</sub> 50 µg/ml + extrait de <i>C.albidus</i> 100 µg/ml</b>	0.16±0.08 <sup>ac</sup>	0.53±0.25 <sup>ahj</sup>	0.03±0.02 <sup>a</sup>	0.06±0.05 <sup>a</sup>

-NaN<sub>3</sub> : Azide de sodium ; AC : aberration chromosomique.

-Deux moyenne sur une même colonne avec des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (p<0,05)

A 18h, les taux d'aberrations chromosomiques ne sont pas significativement différents entre les traitements suivant : eau, DMSO, azide de sodium à 25µg/ml, *C. flammula* à 50µg/ml, *C. albidus* à 50µg/ml, 100µg/ml et 300µg/ml mais aussi l'association azide de sodium/*C. albidus* et azide de sodium/*C. flammula*. Le traitement par l'extrait de *C. flammula* à 100µg/ml et 300µg/ml provoque une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques par rapport aux contrôles négatifs.

Nous remarquons également qu'à 24h, les taux d'aberrations chromosomiques des cellules traitées avec l'extrait éthanolique de *C. albidus* aux différentes concentrations et l'association azide de sodium/*C. albidus* ne présentent pas de différences significatives ( $p < 0,05$ ) par rapport aux contrôles négatifs et positifs à une concentration de 25µg/ml et 50µg/ml ; alors que le traitement avec *C. flammula* aux différentes concentrations et l'association azide de sodium/ *C. flammula* se traduit par une augmentation significative des aberrations par rapport aux contrôles négatifs.

Les pourcentages d'AC des cellules traitées avec l'extrait éthanolique de *C. flammula* à différentes concentrations à 48h sont significativement supérieurs ( $p < 0,05$ ) par rapport à ceux observés dans les contrôles négatifs et positifs. Les taux d'AC des cellules traitées avec les extraits éthanolique de *C. albidus* à différentes concentrations et l'association azide de sodium/ *C. albidus*, azide de sodium/ *C. flammula* sont similaires à ceux du contrôle négatif, alors qu'ils sont significativement inférieurs par rapport aux contrôles positifs.

Les pourcentages d'AC observés dans les racines traitées avec l'extrait éthanolique de *C. flammula* à différentes concentrations à 72h sont significativement inférieurs ( $p < 0,05$ ) à ceux observés après traitement à l'eau distillée et au DMSO. Ces valeurs sont significativement supérieures par rapport à celles observées avec les contrôles positifs à 25µg/ml et 50µg/ml. Nous remarquons également que les taux d'AC enregistrés des racines traitées avec les extrait éthanolique de *C. albidus* à différentes concentrations et l'association azide de sodium/ *C. albidus*, azide de sodium/ *C. flammula* sont similaires à ceux des contrôles négatifs

La plupart des aberrations observées sont des C- mitoses, anaphases perturbées, sticky métaphase et cassures, les tableaux X, XI, XII, XIII et les figures 17, 18, 19, illustrent les différentes anomalies, et la figure 16 montre les stades normaux de la division cellulaire.

**Tableau X:** Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de *Allium cepa* traitées à 18h.

Traitement	Sticky métaphase	Agglomérat	Cassure	C-mitose	Anaphase perturbé	MN
Eau distillé	-	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	5	1	-
NaN <sub>3</sub> 25µg/ml	-	-	-	14	1	-
NaN <sub>3</sub> 50µg/ml	13	-	5	183	-	-
NaN <sub>3</sub> 100µg/ml	5	21	5	469	6	2
<i>C.flammula</i> 50µg/ml	-	-	-	133	8	-
<i>C.flammula</i> 100µg/ml	-	-	4	165	5	-
<i>C.flammula</i> 300µg/ml	-	-	-	119	19	-
<i>C.albidus</i> 50µg/ml	-	-	-	34	4	-
<i>C.albidus</i> 100µg/ml	-	-	-	19	2	-
<i>C.albidus</i> 300µg/ml	-	-	-	18	-	-
NaN <sub>3</sub> 50 µg/ml + <i>C.flammula</i> 100µg/ml	-	-	-	48	3	-
NaN <sub>3</sub> 50 µg/ml + <i>C.albidus</i> 100µg/ml	-	-	-	10	-	-

-NaN<sub>3</sub>: Azide de sodium

**Tableau XI:** Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de *Allium cepa* traitées à 24h.

Traitement	Bridge	Sticky métaphase	Agglomérat	C-mitose	Anaphase perturbé
Eau distillé	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	24	-
NaN <sub>3</sub> 25µg/ml	-	-	-	5	-
NaN <sub>3</sub> 50µg/ml	2	18	4	35	4
NaN <sub>3</sub> 100µg/ml	-	-	-	323	1
<i>C.flammula</i> 50µg/ml	-	-	-	179	14
<i>C.flammula</i> 100µg/ml	-	1	-	235	18
<i>C.flammula</i> 300µg/ml				81	1
<i>C.albidus</i> 50µg/ml	-	-	-	63	6
<i>C.albidus</i> 100 µg/ml	-	-	-	25	-
<i>C.albidus</i> à 300 µg/ml	-	-	-	21	2
NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml + <i>C.flammula</i> 100 µg/ml	-	-	-	128	-
NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml + <i>C.albidus</i> à 100 µg/ml	-	-	-	37	-

-NaN<sub>3</sub> : Azide de sodium

**Tableau XII:** Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de *Allium cepa* traitées à 48h.

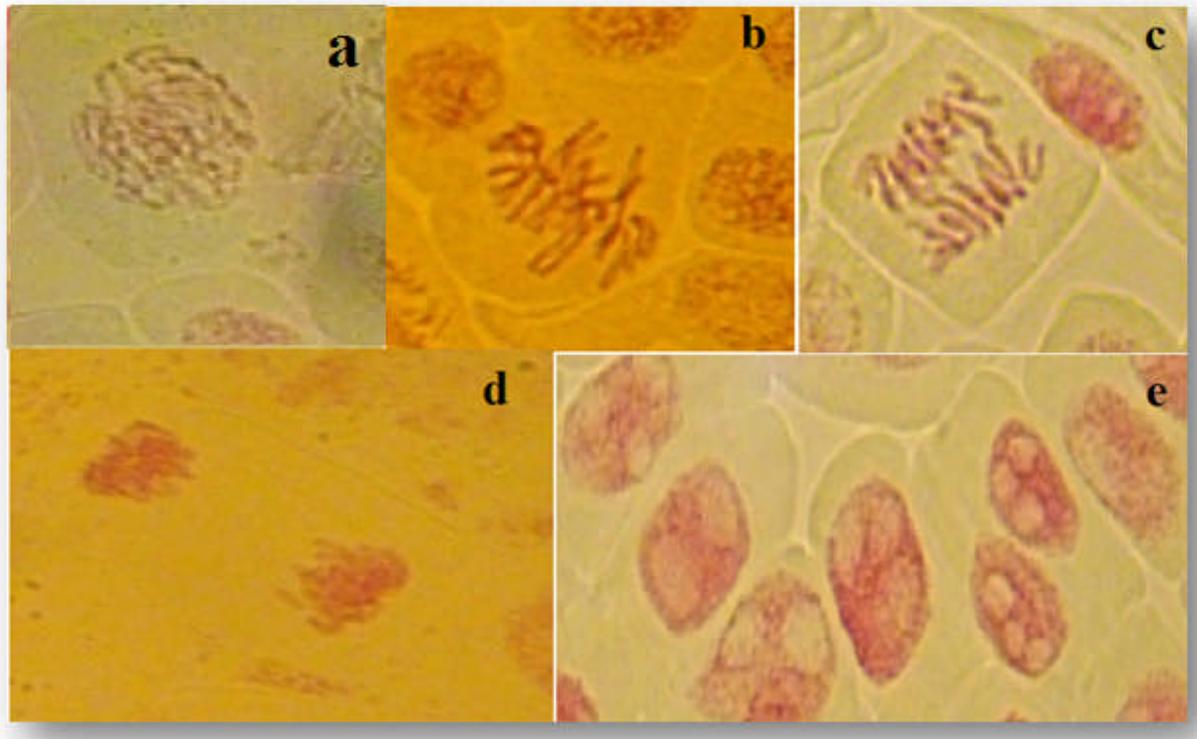
Traitement	Sticky métaphase	Agglomérat	Cassure	C-mitose	Anaphase perturbé
Eau distillé	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	9	2
NaN <sub>3</sub> 25µg/ml	-	-	3	21	1
NaN <sub>3</sub> 50µg/ml	19	-	-	79	-
NaN <sub>3</sub> 100µg/ml	-	1	-	79	-
<i>C.flammula</i> 50µg/ml	-	-	-	120	2
<i>C.flammula</i> 100µg/ml	-	-	-	134	-
<i>C.flammula</i> 300µg/ml	-	3	-	129	4
<i>C.albidus</i> 50µg/ml	-	-	-	24	-
<i>C.albidus</i> 100 µg/ml	-	-	-	34	1
<i>C.albidus</i> 300 µg/ml	-	-	-	15	-
NaN <sub>3</sub> 50µg/ml + <i>C.flammula</i> 100µg/ml	-	-	-	3	-
NaN <sub>3</sub> 50 µg/ml + <i>C.albidus</i> 100 µg/ml	-	-	-	2	-

-NaN<sub>3</sub> : Azide de sodium

**Tableau XIII:** Les différentes aberrations observées sur environ 6000 cellules calculées des racines de *Allium cepa* traitées à 72h.

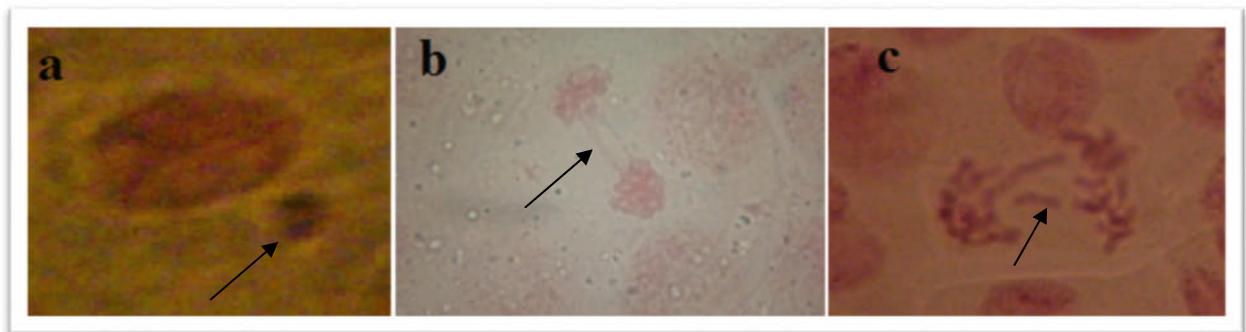
Traitement	Sticky métaphase	Agglomérat	Cassure	C-mitose	Anaphase perturbé
Eau distillé	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	1	-
NaN <sub>3</sub> 25µg/ml	-	-	-	4	-
NaN <sub>3</sub> 50µg/ml	-	3	-	16	1
NaN <sub>3</sub> 100µg/ml	-	1	2	141	-
<i>C.flammula</i> 50µg/ml	-	-	-	46	4
<i>C.flammula</i> 100µg/ml	-	-	-	34	1
<i>C.flammula</i> 300µg/ml	-	1	3	82	-
<i>C.albidus</i> 50µg/ml	-	-	-	36	-
<i>C.albidus</i> 100 µg/ml	-	-	-	35	3
<i>C.albidus</i> 300 µg/ml	-	-	-	23	-
NaN <sub>3</sub> 50 µg/ml + <i>C.flammula</i> 100 µg/ml	-	-	-	1	-
NaN <sub>3</sub> à 50 µg/ml + <i>C.albidus</i> 100 µg/ml	-	-	-	4	-

-NaN<sub>3</sub>: Azide de sodium



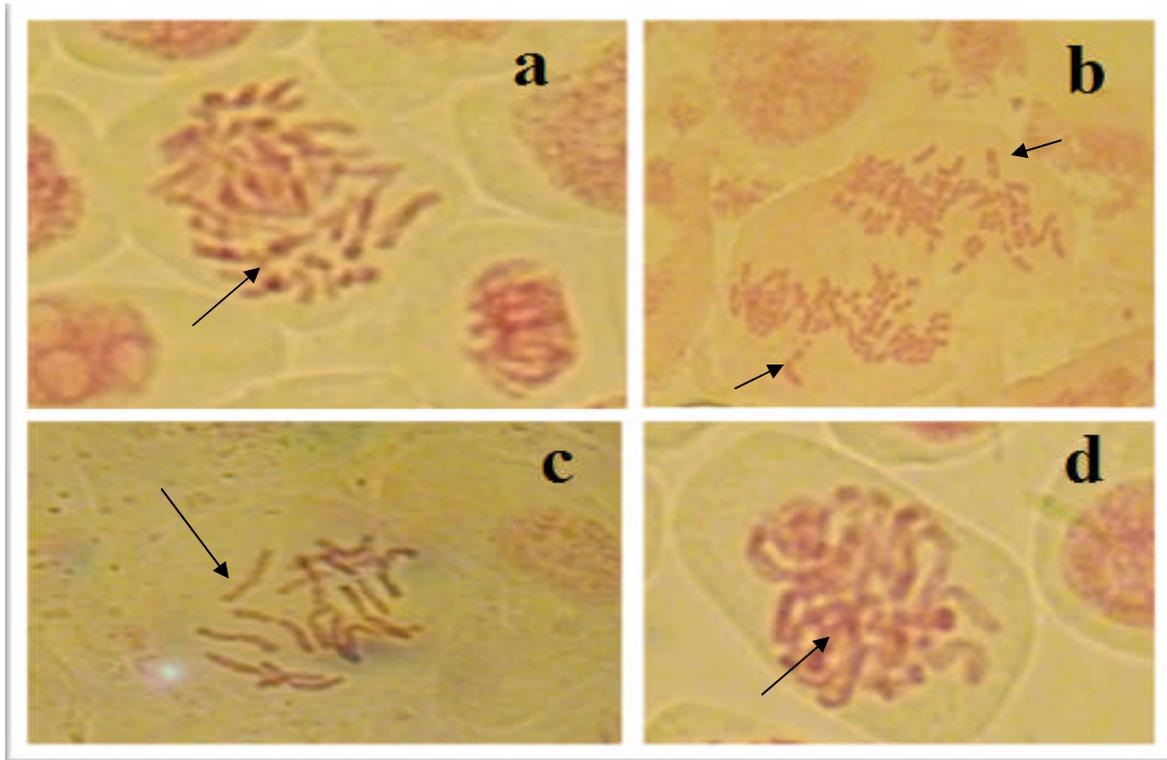
**Figure 16:** Stades normaux de la mitose dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* (GX40).

(a) Prophase, (b) Métaphase, (c) Anaphase, (d) Téléphase, (e) Interphase.



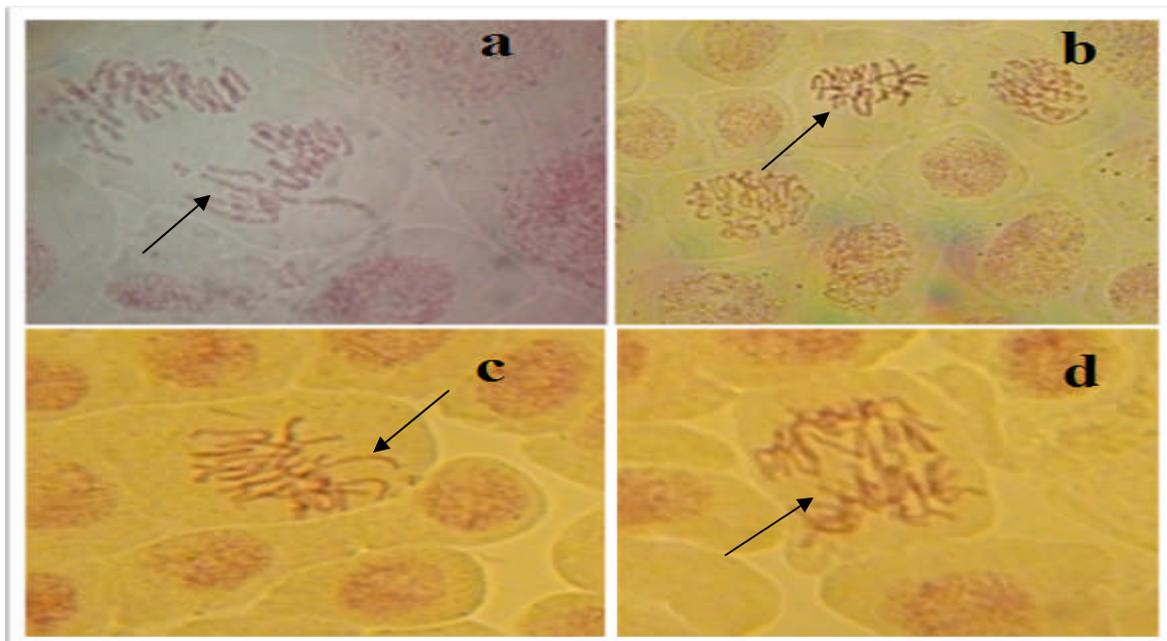
**Figure 17:** Stades perturbés de la mitose dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* traitées avec l'azide de sodium (GX40).

(a) Micronoyau, (b) Pont chromosomique, (c) Chromosome isolé.



**Figure 18:** Stades perturbés de la mitose dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* traitées avec *C. flammula* (GX40).

(a) Anaphase perturbé, (b) Cassures (c) Chromosomes en désordre, (d) C-mitose.



**Figure 19 :** stades perturbés de la mitose dans les cellules méristématiques de *Allium cepa* traitées avec *C. albidus* (GX40).

(a) Cassures, (b) C-mitose, (c) Sticky métaphase, (d) Anaphase perturbée.

*Allium cepa* est considéré comme un modèle de référence pour l'évaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité (**Lubini et al., 2008 ; Bagatini et al., 2009**). Cette espèce possède des chromosomes peu nombreux (n=16) de grande taille, qui rendent facile la détection des aberrations chromosomiques et les perturbations de la division cellulaire (**Barbério et al., 2011**). De plus, *Allium cepa* est considéré comme étant similaire aux organismes mammifères en matière de détection des altérations cytogénétiques engendrées par les substances chimiques (**Bhujbal et al., 2011**), en raison des corrélations observées entre ce test et les différents tests de génotoxicité utilisés chez les mammifères (**Tedesco et laughinghouse, 2012**).

Des paramètres tels que la consistance, la coloration, la forme et la croissance des racines peuvent être utilisés pour estimer la cytotoxicité au niveau des racines de *Allium cepa* (**Bakare et Wale-Adeyemo, 2004**).

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les paramètres macroscopique et microscopique entre les lots traités avec l'eau distillée et ceux traités avec le DMSO, ce qui indique que le DMSO n'exerce aucune action cytotoxique ou génotoxique.

Nous avons noté une inhibition significative de la croissance des racines lors du traitement avec l'extrait *C. flammula*, *C. albidus* à 300µg/ml et les mélanges azide de sodium et extraits de plantes. L'inhibition de la croissance indique une cytotoxicité due à un arrêt de l'activité mitotique. Les valeurs négatives observées dans certains lots seraient probablement dues à l'entrée des cellules de *Allium cepa* en apoptose, ce qui se traduit par un raccourcissement et une dégénérescence des racines (**Khanna et Sharma, 2013**).

L'indice mitotique est utilisé comme indicateur de la prolifération cellulaire, il renseigne sur la fréquence des cellules en division sa réduction reflète une cytotoxicité (**Ping et al., 2012**). La baisse de l'indice mitotique des cellules traitées avec les extraits est en corrélation avec les observations macroscopiques et confirme la cytotoxicité de ces extraits aux concentrations testées.

L'analyse des IM obtenus a montré que l'azide de sodium à 25, 50 et 100µg/ml provoque une réduction significative du nombre de cellules en division, ceci est en corrélation avec les données bibliographiques. En effet, l'azide de sodium est connu pour être cytotoxique pour

les plantes supérieures, les bactéries, les levures et les mammifères (Kleinhofs et al., 1978). Li et al (2011) suggèrent que la baisse de l'IM des cellules méristématiques de *Allium cepa* pourrait être interprété par la mort cellulaire due à l'azide de sodium. Cette réduction peut aussi être expliquée par l'inhibition de la synthèse de l'ADN ou le blocage dans la phase G2 du cycle cellulaire (Sudhakar, 2001),

Les aberrations chromosomiques sont des changements du nombre et de la structure des chromosomes résultant d'une rupture ou d'un échange de matériel chromosomique (Olorunfemi et Ehwre, 2011). La plupart des AC observées dans les cellules sont létales, mais il ya beaucoup d'aberrations qui sont viables et peuvent causer des effets génétiques, somatiques ou héréditaires (Akinboro et Bakare, 2007). L'analyse des aberrations chromosomiques permet donc l'estimation des effets génotoxiques (Ragunathan et Panneerselvam, 2007).

Le pourcentage des cellules présentant des aberrations chromosomiques après traitement avec l'extrait de *C. albidus* n'est pas significativement différent par rapport aux contrôles négatifs, ceci indique que cet extrait n'a pas d'action génotoxique aux concentrations testées. Nous avons noté que l'azide de sodium et l'extrait de *C. flammula* exercent un effet génotoxique, le nombre de cellules présentant des aberrations est extrêmement élevé.

Les extraits de *C. flammula* et *C. albidus* à 100µg/ml ont exprimé une protection contre le pouvoir mutagène de l'azide de sodium. En effet Le nombre d'aberrations chromosomiques observées est significativement moins élevé dans les cellules traitées avec l'association azide de sodium et les extraits des deux plantes, ceci montre que les extraits exercent une action antigénotoxique vis-à-vis de la génotoxicité induite par l'azide de sodium, par contre ils n'exercent aucun effet anticytotoxique.

La bibliographie rapporte que l'activité antimutagène de certains composés est préférentiellement exprimée lorsqu'ils sont administrés en même temps l'administration de l'agent mutagène. Il a été observé que les polyphénols expriment une protection contre le pouvoir mutagène de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>). Nakasugi, (2000) suggère que ces composés agissent en tant qu'antimutagènes à l'égard de NaN<sub>3</sub> en affectant le système de réparation de l'ADN après avoir été attaqué par l'agent mutagène.

Parmi les aberrations on note une hausse des cellules en c-mitose qui s'expliquerait par l'inhibition de la formation du fuseau achromatique, un effet semblable à celui de la colchicine (**Turkoglu, 2007**), et l'apparition des ponts anaphasiques (bridges) qui sont formés probablement par la fusion des chromatides lors de la séparation des chromosomes en anaphase (**Sifa, 2007**). Les chromosomes collants conduisent généralement à la formation de ces ponts pendant la fin de la métaphase et l'anaphase et ce jusqu'à inhiber la télophase et la cytokinèse, entravant ainsi la division cellulaire (**Bhujbal et al., 2011**). Leur formation est causée par des réactions avec l'ADN au cours de ses périodes de repos ce qui provoque la réticulation ADN-ADN ou ADN-protéine (**Amin, 2002**). Ces chromosomes collants peuvent aussi être interprétés comme un résultat de la dépolymérisation de l'ADN, la dissolution partielle des nucléoprotéines, la rupture et l'échange d'unité de base de chromatides et le décapage du revêtement protéiques de l'ADN dans les chromosomes (**Abdel Migid et Abdelrahman, 2013**).

Les micronoyaux seraient le résultat de fragments acentriques ou de chromosomes entiers qui ne sont pas intégrés dans le noyau principal au cours du cycle cellulaire. Les chromosomes retardataires peuvent également se développer en chromosomes isolés résultants d'une répartition inégale du matériel génétique, ou constituer des membranes nucléaires autour d'eux, formant ainsi des micronoyaux (**Bakare et al., 2000**).

Les activités génotoxique et cytotoxique des extraits de plantes sont probablement dues à la présence des composés phénoliques dans les extraits interférant avec les protéines du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN (**Edziri et al., 2011 ; Patel et al., 2012**). Des travaux ont montré que les composés actifs, particulièrement, les polyphénols, les alcaloïdes et les terpenoïdes ont une action antimittotique et se comportent comme des inhibiteurs d'enzymes impliquées dans le processus du cycle cellulaire. En effet, l'inhibition des enzymes mitochondriales telles que la succinoxidase par les flavonoïdes tels que, la quercétine, la myrcétine et la quercétagétine subissaient une autooxydation ce qui entraîne la formation du peroxyde d'hydrogène, le superoxyde et le radical hydroxyl (**Jorgensen et al., 1998 ; Olsen et al., 1981 ; Doroshov et al., 1980**). Sanyal et al. (1997) ont montré que, la coumarine, la vanilline, la caféine, l'acide tannique et cinnamaldéhyde augmentent la formation des micronoyaux à des concentrations élevées.

On peut déduire à partir de ces résultats que les extraits éthanoliques de *C. flammula* et *C. albidus* sont riches en composés bioactifs qui ont pu s'interférer avec les composantes du cycle cellulaire et induire un effet génotoxique et cytotoxique, mais aussi des composés ayant un effet protecteur vis-à-vis de la génotoxicité induite par l'azide de sodium.

## Conclusion

---

Notre étude a pour objectif, d'une part, l'évaluation des potentiels génotoxiques et cytotoxiques des extraits éthanoliques de deux plantes médicinales *Clematis flammula* et *Cistus albidus*, et d'autre part la mise en évidence d'éventuels effets antigénotoxiques et anticytotoxiques, en utilisant le test *Allium cepa*.

Les résultats de ce test démontrent que :

- Les extraits éthanoliques de *C. flammula* et *C. albidus* sont légèrement cytotoxiques à faibles concentrations (50 et 100µg/ml). Alors qu'une concentration plus élevée est fortement cytotoxique, en effet une inhibition significative de la croissance en longueur des racines a été observée à une concentration de 300µg/ml extrait.
- Les résultats montrent également que les extraits éthanoliques de *C. flammula* et *C. albidus* n'induisent pas d'effet anticytotoxique vis-à-vis la cytotoxicité de l'azide de sodium ; l'association des extraits avec l'azide de sodium induit une réduction significative de l'indice mitotique par rapport aux témoins.
- Le traitement avec l'extrait éthanolique de *C. flammula* provoque une augmentation significative des pourcentages d'aberrations par rapport aux contrôles négatifs, ceci indique que cet extrait est génotoxique aux concentrations testées.
- Le traitement avec l'extrait éthanolique de *C. albidus* aux différentes concentrations n'induit pas d'augmentation significative des taux d'aberrations par rapport aux contrôles négatifs, ce qui indique que cet extrait n'est pas génotoxique.
- Les taux d'aberrations chromosomiques observées lors du traitement par l'association à l'azide de sodium/extraits de plantes sont inférieurs à ceux du contrôle positif, ce qui indique que les extraits de *C. flammula* et *C. albidus* ont une action antigénotoxique.

En perspective, il serait intéressant de compléter ce travail par d'autres études:

- Déterminer la  $DL_{50}$  des composés actifs sur le modèle *A. cepa*.
- Réaliser d'autres tests de génotoxicité.
- Elucider le mécanisme d'action des composés actifs.

## A

**Abdel Migid H.M. et Abdelrahman H.M.H. (2013).** Phyto-genotoxicity assessment of sewage water for agriculture applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4: 511-529.

**Aftab T., Masroor M., Khan A., Naeem M., Mohd I. T.O., Siddiqi M. et Varshney L. (2014).** Effect of irradiated sodium alginate and phosphorus on biomass and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Carbohydrate Polymers Elsevier*. 110: 396–404.

**Akinboro A., Bakare A.A. (2007).** Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 470–475.

**Amin A.W. (2002).** Cytotoxicity testing of sewage water treatment using *Allium cepa* chromosome aberrations assay. *Pakistan Journal of Biology Science*. 5: 184-188.

**Antolovich M., Prenzler P., Robards K. et Ryan D. (2000).** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*. 125: 989–1009.

**Artajo L.S., Romero M.P. et Motilva M.J. (2006).** Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 518–527.

**Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H, Debbache N. et Atmani D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*. 112: 303-309.

**Atmani D., Ruiz-Larrea M. B., Ruiz-Sanz J. I., Lizcano L. J., Bakkali F. et Atmani D. (2011).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 589-598.

## B

**Babar Ali M., Singh N., Shohael A.M., Hahn E. J. et Paek K.Y. (2006).** Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science*. 171: 147–154.

**Bagatini M.D., Vasconcelos T.G., Laughinghouse IV H.D., Martin A.F. et Tedesco S.B. (2009).** Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. *Environmental Contamination Toxicology*. 82: 590-592.

**Bakare A.A., Mosuro A.A. et Osibanjo O. (2000).** Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa* (L). *Journal of Environmental Biology*. 21: 263-271.

**Bakare A.A. et Wale-Adeyemo A.R. (2004).** The potential mutagenic and cytotoxic effects of leachates from domestic wastes and Aba-Eku landfill Nigeria on *Allium cepa*. *Journal of Nature Environment Pollution Technology*. 3: 455–462.

**Bakare A.A., Adeyemi A.O., Adeyemi A., Alabi A.O. et Osibanjo O. (2012).** Cytogenotoxic effects of electronic waste leachate in *Allium cepa*. *Caryologia:International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 65: 94-100.

**Balasundram N., Sunddram K. et Samman S. (2005).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*.99: 191-203.

**Barbério A., Voltolini J.C. et Mello M.L.S. (2011).** Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*. 20: 927-935.

**Benkhniq O., Zidane, L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A., et Douira A. (2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica*. 53: 191-216.

**Berthelot-Ricou A., Perrin J., Orsière T., Aye M., Roustan A., Botta A. et Courbiere B. (2013).** Risque génotoxique et ovocytes : Principes de toxicologie génétique et applications. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*. 41 :544-547.

**Bhujbal S.S., Deshmukh R.P., Bidkar J.S., Thatte V.A., Awasare S.S. et Garg P.P. (2011).** Evaluation of cytotoxic activity of barks of *Mimusops elengi*. *EurAsian Journal of Biosciences*. 5: 73-79.

**Bonassi S., Abbondandolo A., Camurri L., Dal Pra L., De Ferrari M. et Degrassi F. (1995).** Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genetic Cytogenetic*.79:133-5.

**Borboa L. et Delatorre C. (1996).** The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New phytol*. 134: 481-486.

**Boros B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhare Z., Kilar F. et Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography*. 1217: 7972–7980.

**Botta A. (2006).** Relations entre génotoxicité, mutagénèse et cancérogénèse. *Annales* : 28 :9-13.

**Boubaker J., Skandrani I., Bouhlel I., Ben sghaier M., Neffati A. et Ghedira K. (2010).** Mutagenic, antimutagenic and antioxidant potency of leaf extracts from *Nitraria retusa*. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2283–2290.

**Boucher I. (2002).** Les modifications génétiques chez les microorganismes. *Commission de l'éthique de la science et de la technologie*.pp 1-12.

**Boudet A.M. (2007).** Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 68: 2722–2735.

**Boutin V., Fogelgesang J. F., Beaux J. F. et Ribola F. (2010).** Atlas de biologie végétale. Dunod. Paris. 128p.

**Breu W. (1996).** *Allium cepa* L. (Onion) Part 1: Chemistry and analysis. *Phytomedicine*. 3:293-306.

**Butt S.K. et Vahidy A.A. (1994).** Cytotoxic effects of herbicide Ronstar on meristematic cells of *Allium cepa* L. Pakistan. *Journal of Botanic*. 26: 69-74.

## C

**Cachot J. (2009).** La génotoxicité : Quel risque pour les espèces aquatiques. *Fascicules Seine aval*. pp 1-36.

**Calame M. (2007).** Une agriculture pour le XXI<sup>e</sup> siècle : Manifeste pour une agronomie biologique. Charles Léopold Mayer. Paris. 153p.

**Camparoto M.L. Teixeira R.O. Mantovani M.S. et Vicentini V.E.P. (2002).** Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip rat bone-marrow cells. *Genetic Molecular Biology*. 25: 85-89.

**Caria H., Chaveca T., Laires A. et Rueff J. (1995).** Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line, and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research*. 343:85–94.

**Charmot D. (2006).** Le cycle cellulaire, la mitose et la méiose. Edition De Boeck. Marseille. 212p.

**Chawla, R., Kumar S., et Sharma A. (2012).** The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*. 143 : 116–150.

**Collins A. (2004).** The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 26: 249-261.

**Cortés F., Rodriguez-Higuera J.M. et Escalza. (1985).** Different cytotoxic effects induced by maleic hydrazide in root meristem cells. *Environmental and Experimental Botany*. 25: 183-188.

**Cotelle S. (1999).** Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures. Thèse de doctorat. Université de Metz. 257p.

**Cotelle S. et Féraud J.F. (1999).** Comet assay in genetic ecotoxicology. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.

## **D**

**D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali - Istituto Superiore di Sanità*. 43: 348-361.

**David C. (2013).** Les agents biologiques. Institut National de Recherche et de sécurité. Paris. 117 : 1-4.

**Dearfield K.L., Cimino M.C., McCarroll N.E., Mauer I. et Valcovic L.R. (2002).** Genotoxicity risk assessment: A proposed classification strategy. *Mutation Research*. 521: 121-135.

**Delattre B. (2006).** Biologie : La mitose. Edition Dunod. pp 1-21.

**Dey P. M., Brownleader M. D. et Harbone J. B. (1997).** The plant, the cell and its molecular components. *Plant biochemistry*.12: 32-34.

**Dhawan A., Bajpayee M. et Parmar D. (2009).** Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*.25: 5-32.

**Diffley J.F. (2004).** Regulation of early events in chromosome replication. *Current Biology*. 14:778-786.

**Dimas K., Demetzos C., Angelopoulou D, Antonios K. et Mavromoustakos T. (2000).** Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines *in vitro*. *Pharmacological Research*. 42: 467-478.

**Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R. J. et Jha A.N. (2002).** Marine invertebrate ecogenotoxicology. *Mutagenesis*. 17: 495-507.

**Doroshov J.H., Locker G. Y. et Myers C. E. (1980).** Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *Journal Clinique Investigation*. 65:128–135.

**Dykes L. et Rooney L.W. (2006).** Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences*. 44: 236 - 241.

## **E**

**Edeas M. (2010).** Polyphénols et jus de grenade. *Phytothérapie*. 8: 16–20.

**Edziri H., Mastouri M., Mahjoub A., Anthonissen R., Mertens B., Cammaerts S., Gevaert L. et Verschaeve L. (2011).** Toxic and mutagenic properties of extracts from Tunisian traditional medicinal plants investigated by the neutral red uptake, VITOTOX and alkaline comet assays. *South African Journal of Botany*. 77: 703-710.

**Effraim K.D., Jacks T.W. et Sodipo O.P. (2001).** Histopathological studies on the toxicity of Ocimum leave extract on some organs of rabbit. *African Journal of Biomedical research*. 6: 21-25.

**Escarpa A. et Gonzalez M.C. (2001).** An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Analytical Chemistry*. 31:57-139.

## **F**

**Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 372–379.

**Favaudon V. (2000).** Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite. Éditions scientifiques et médicales. 4 : 355-68.

**Ferbeyre G. (2000).** Le cycle cellulaire. *Molecular Biology of the Cell*. 100 : 71-78.

**Ferguson L.R. (2000).** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*. 475: 89–111.

**Fiskesjo G. (1988).** *Allium* test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*. 197: 243-260.

**Fiskesjo G. (1987).** The *Allium* test- an alternative. *Atla*. 15: 33-35.

**Fiskesjo G. (1997).** *Allium* for screening chemicals: Evaluation of cytological parameters. *Plants for Environmental Studies*. pp 307-333.

**Fraga C.G. (2010).** Plant phenolics and human health. *Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edition John Wiley and Sons. pp 22-25.

**Fukasawa K. (2007).** Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nature Reviews Cancer*. 7:911-924.

## **G**

**Gonçalves S., Gomes D., Costa P. et Romano A. (2013).** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 43: 465– 471.

**Grant W.F. (1982).** Plant mutagen assays based upon chromosome mutations. *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology*. pp 1-24.

**Guinard J. L. (1998).** Botanique. 11<sup>ème</sup> édition révisée. Edition Masson. 278p.

**Guiraud J. P. (1993).** Génétique microbienne : Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Techniques et documentation. Lavoisier. pp 89-111.

**Guy R.C. (2014).** Ames test. *Encyclopedia of toxicology*.3: 187-188.

## **H**

**Hagmar L., Bonassi S., Stromberg U., Brogger A., Knudsen L.E. et Norppa H. (1998).** Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Research*. 58: 4117-21.

**Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G et Rakesh D.D. (2008).** Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies*. 259p.

**Heim K.E., Tagliaferro A.R. et Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572–584.

**Herrero J.M., Pérez M., Freire P.F., Lopez L.C., Peropadre A. et Hazen M.J. (2012).** Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. Darwin. 280p.

## J

**Jorgensen L.V., Cornett C., Justesen U., Skibsted L.H. et Dragsted L.O. (1998).** Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Radical Research*. 29:339–350.

**Jorgensen P. et Tyers. M. (2004).** How cells coordinate growth and division. *Current Biology*. 14:1014-1027.

## K

**Kanaya N., Gill B.S., Grover I.S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S.S. et Anderson H.C. (1994).** *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Research*. 310: 231-247.

**Karou D., Dicko M.H., Simpore J. et Traore A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. 4: 823-828.

**Khanna N. et Sharma S. (2013).** *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*. 1:105-119.

**Kleinhofs A., Owais W.M. et Nilan R.A. (1978).** Azide. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 55:165-195

**Klug W.S., Cummings M.R. et Spencer C. A. (2006).** Génétique. 8<sup>ème</sup> édition. Pearson. Paris. 872p.

**Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C. A. et Palladino M. A. (2010).** Essentials of Genetics. 7<sup>ème</sup> édition. Pearson. Paris. 236p.

**Kumari M., Mukherjee A. et Chandrasekaran N. (2009).** Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*. 409: 5243–5246.

**Kumari M., Khan S.S., Pakrashi S., Mukherjee A. et Chandrasekaran N. (2011).** Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Bulletin World Health Organisation*. 63: 965-981.

## L

**Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M. et Hseini S.N. (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Revue de botanique*. 186 :4-30.

**Lazarou D., Grougnet R. et Papadopoulos A. (2007).** Antimutagenic properties of a polyphenol-enriched extract derived from sesame-seed perisperm. *Mutation Research*. 634: 163–171.

**Le Blanc-Louvry I., Laburthe-Tolra P., Massol V., Papin F., Goullé J. P., Lachatre G., Gaulier J. M. et Proust B. (2012).** Suicidal sodium azide intoxication: An analytical challenge based on a rare case. *Forensic Science International*. 221: 17-20.

**Li L., Zhou Y., Sun L., Xing G., Tian C., Sun J., Zhang L. et He F. (2007).** NuSAP is degraded by APC/C-Cdh1 and its overexpression results in mitotic arrest dependent of its microtubules affinity. *Cell Signal*. 19:2046-55.

**Li, Z. Xin-Rui, C. Juan-Juan, H. Lan, S. Guan-Hua, D. (2011).** Neuroprotective effects of hyperoside on sodium azide-induced apoptosis in PC12 cells. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 9: 0450–0455.

**Lubini G., Fachinetto J.M., Laughinghouse IV H.D., Paranhos J.T., Silva A.C.F. et Tedesco S.B. (2008).** Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia*. 63: 647-651.

## **M**

**Ma T.H., Xu C., Liao S., McConnell H., Jeong B.S. et Won C. D. (1995).** *In situ* monitoring with the Tradescantia bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator. *Mutation research*. 359 : 39-52.

**Macheix J.J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle : Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Technologie et documentet. Paris. pp 380-398.

**Marc E., Nelly A., Annick D. D. et Frederic D. (2008).** Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Ledanon. *Journal of ethnopharmacology*. 120: 315-334.

**Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51: 304–315.

**Meijer L. (2003).** Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*. 5: 311-326.

**Michel C. (2011).** Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* : Indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. 193p.

**Min B.R. et Hart S.P. (2003).** Tannins for suppression of internal parasites. *American Society of Animal Science*. 81:102–109.

**Ming-shu L., Kai Y., Dong-ying J. et Qiang H. (2006).** Microbial degradation of hydrolysable tannins. *Chemistry and Industry of Forest Products*. 26: 137-150.

**Mirjana P.A., Visnja Besendorfer A., Jadranka R.B. et Drazena P. (2000).** The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur L.*) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*). *Chemosphere*. 41: 1512-1527.

## **N**

**Nabors M. (2009).** Biologie végétale. Structure, fonctionnement, écologie et biotechnologie. Edition Pearson. Paris. 640p.

**Nacz M. et Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. 1054 : 95–111.

**Nacz M. et Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1523–1542.

**Nakasugi T., Nakashima M. et Komai K. (2000).** Antimutagens in Gaiyou. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3256–3266.

**Navarrete M. H., Carrera P., de Miguel M. et DelaTorre C. (1997).** A fast comet assay for solid tissue cells: The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutation Research*. 389: 271-277.

**Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G. et Vanleewen P.A.M. (2001).** Flavonoids: Review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Chemical Nutrition*. 74:418-425.

## **O**

**Olorunfemi D.I. et Ehwre E.O. (2011).** Chromosomal aberrations induced in root tips of *Allium cepa* by squeezed *Garri* extracts. *Report and Opinion*. 3: 155-160.

**Olsen R.D., Boerth R.C., Gerber J.G. et Nies A.S. (1981).** Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: Evidence for oxidative stress. *Life Science*. 29:1393–1401.

## P

**Paes-Leme A.A., Motta E.S., De Mattos, J.C.P., Dantas F.J.S., Bezerra R.J.A.C. et Caldeira-de-Araujo A. (2005).** Assesment of *Aloe vera* (L) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 197-201.

**Pala-Paul J., Velasco-Negueruela A. et Pérez-Alonso J. (2005).** Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain. *Journal of Essentials Oil Research*.17: 19-22.

**Panda K. K., Patra J. et Panda, B. B. (1996).** Induction of sister chromatid exchanges by heavy metal salts in root meristem cells of *Allium cepa*. *Biology Plantarum*. 38: 555-561.

**Parry J.M. et Sors A. (1993).** The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Progress. *Mutaion Research*. 287 : 3-15.

**Passarge E. (2003).** Atlas de poche génétique. 2<sup>ème</sup> Edition. Flammarion. Paris. 460p.

**Patel D.K., Prasad S.K., Kumar R. et Hemalatha S. (2012).** An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*. 320-330.

**Petit J.M., et Julien R. (2007).** Mini manuel de génétique. Edition Dunod. Paris. 260p.

**Pillière F. et Falcy M. (1991).** Exposition aux produits chimiques génotoxiques : Marqueurs biologiques pour la surveillance des salariés. *Documents pour le médecin du travail*. 336p.

**xPing K.Y., Darah I, Yusuf U.K., Yeng C. et Sasidharan S. (2012).** Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* assay. *Molecules*. 17: 7782-7791.

## Q

**Quézel P. et Santa S. (1962).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. 656p.

## R

**Ragunathan I. et Panneerselvam, N. (2007).** Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*, *Journal of Zhejiang University*.pp 470-475.

**Rameau J.C., Mansion D., Dumé G. et Gauberville C. (2008).** La flore forestière française (guide écologique illustré), tome 3: Région méditerranéenne. Institut pour le développement forestier. 2426p.

**Rank J., Lopez L., Mette H. et Moretton, J. (2002).** Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*. 136: 13-18.

**Rauha J.P. (2001).** The search for biological activity in finnish plant extracts containing phenolic compounds. Thèse de Doctorat. Université de Helsinki. Finlande. 306p.

**Robards K. (2003).** Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography*. 1000: 657–691.

## **S**

**Samouelian F., Gaudin V. et Boccara M. (2009).** Génétique moléculaire des plantes. Quae. Paris. 230p.

**Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K. et Linn S. (2004).** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*. 73:39-85.

**Sanyal R., Darroudi F., Parzefall W., Nagao W. et Knasmüller S. (1997).** Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human-derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis*. 12 :297-303.

**Saraç N. et Şen B. (2014).** Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products*. 53: 60– 64.

**Sarni-manchado P et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Technologie et documentet. Paris. pp 09.

**Schmid W. (1975).** The micronucleus test. *Mutation Research*. 31:9-15.

**Sharm S., Bhat T.K. et Dawra R.K. (1999).** Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger*. *World journal of microbiology and biotechnology*.15: 673-677.

**Shimoi K., Nakamura Y., Tomita I. et Kada T. (1985).** Bio-antimutagen effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutation Research*. 149: 17-23.

**Şifa T. (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.

**Sikora A., Janion C. et Grzesiuk E. (2012).** Bacterial systems for testing spontaneous and induced mutations. *Mutagenesis*. 8: 154-178.

**Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M. et Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*. 89: 191-198.

**Skibola C.F. et Smith M.T. (2000).** Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Biology and Medicine*. 29 : 375–383.

**Stansfield W. (2003).** Génétique. Edition Dunod. Paris. 165p.

**Sudhakar R., Gowda N. et Venu G. (2001).** Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. *Cytologia*. 66: 235-239.

## **T**

**Tarantini A. (2009).** Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. Thèse de doctorat, Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement de Grenoble. 174p.

**Tedesco S.B. et Laughinghouse IV H.D. (2012).** Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. *Environmental Contamination*. pp 137-156.

**Teixeira R.O., Camparoto M.L., Mantovan M.S. et Vinentini, V.E.P. (2003).** Assesment of two medicinal plants, *Psidium guajave* L. and *Achillea millifolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. *Genetic and Molecular Biology*. 26: 551-555.

**Turkoglu S. (2007).** Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 626: 4-14.

## **U**

**Ullah M.F. et Khan M.W. (2008).** Food as medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*.9: 187-196.

## **V**

**Van Hummelen P., Deleener A., Vanparys Ph. et Kirsch-Volders M. (1992).** Discrimination of aneuploidogens from clastogens by c-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow. *Mutation Research*. 271: 13-28.

**Vanparys P., Vermeiren F., Sysmans M. et Temmerman R. (1990).** The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Research*. 244: 95-103.

**Vermerris W. et Nicholson R. (2006).** Phenolic Compound Biochemistry: Chapter 3: Biosynthesis of phenolic compounds. pp 63-134.

**Viallard J.F., Lacombe F., Belloc F., Pellegrin J.L. et Reiffers J. (2001).** Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : Aspects fondamentaux et implications en cancérologie. Éditions scientifiques et médicales. 5 : 109-29.

**Vincent F. (1993).** Rapport relatif au projet d'étude en génotoxicité de l'environnement marin. Nantes. Lavoisier. pp 4-47.

## **W**

**Waters M. D., Stack H. F., Brady A. L., Lohman P. H., Haroun L. et Vinio H. (1988).** Use of computerized data listing and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds. *Mutation Research*. 205:1067-1074.

**Winter P.C., Hickey G.I. et Fletcher H.L. (2000).** L'essentiel en génétique. *Port Royal livers*. pp 101-115.

**Wollgast J. et Anklam E. (2000).** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 33: 423 - 447.

## **X**

**Xia E., He X., Li H., Wu S., Li S. et Deng G. (2014).** Biological activities of polyphenols from grapes. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 1:47-58.

## **Z**

**Zerbo P., Millogo-Rasolodimby J., Nacoulma O.G. et Van damme P.(2012).** Plantes médicinales et pratiques médicales au Burkina Faso: cas des Sanan. pp : 1-13.

## Annexes N°1 : Matériels et réactifs du laboratoire.

**Tableau 1** : Le matériel et réactif du laboratoire.

Matériels	Réactifs
-Etuve (Mettler, Ecocell, Binder)	-Eau distillée.
-Bain marie (Mettler)	-Ethanol absolu
-Plaques agitatrices (VELP Scientifica AM4) et Barreaux magnétiques.	-Acide acétique 45%.
-Balance électronique (RADWAG Ps/C/2, précision $\pm 0,019$ ).	-Carmin acétique.
-Microscope électronique (Zeiss West Germany).	-HCl 1N.
-Sonicateur (Ultrasonic Cleaner Raypa).	-CaSO <sub>4</sub> .
-Vortex.	-MgSO <sub>4</sub> .
-Pieds à coulisse.	-NaHCO <sub>3</sub> .
-Réfrigérateur.	-KCl.
-Lames et lamelles.	-DMSO.
-Loupe optique (Zeiss).	-Azide de sodium (NaN <sub>3</sub> ).
-Papier absorbant.	
-Appareil photo.	
-Pince fine.	
-Seringue.	
-Verrerie : tubes à essai, béchers, erlenmeyer, éprouvettes, cristallisoirs, micropipettes, pipettes.	

## Résumé

---

Les potentiels génotoxique et cytotoxique des extraits éthanoliques de deux plantes médicinales locales ; *Clematis flammula* et *Cistus albidus* ont été évalués en utilisant le test *Allium cepa*. Les extraits ont été testés à 50µg/ml, 100µg/ml et 300µg/ml, l'azide de sodium a été utilisé comme contrôle positif à 25 µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, l'eau distillée et le DMSO comme contrôles négatifs. Les résultats obtenus montrent que les extraits éthanoliques de *C. flammula* et *C. albidus* sont légèrement cytotoxiques à faibles concentrations (50 et 100µg/ml), alors qu'une concentration plus élevée (300µg/ml) est fortement cytotoxique, ces extraits n'induisent pas d'effet anticytotoxique vis-à-vis la cytotoxicité de l'azide de sodium. Les pourcentages d'aberrations observées après traitement avec l'extrait *C. flammula* sont significativement élevés par rapport aux contrôles négatifs, ceci indique que cet extrait est génotoxique aux concentrations testées. Les taux d'aberrations chromosomiques observées lors du traitement par l'association avec l'azide de sodium/extraits de plante sont inférieurs à ceux du contrôle positif, ce qui indique que les extraits ont une action antigénotoxique.

**Mots clés :** *C.flammula*, *C.albidus*, génotoxicité, cytotoxicité, *Allium cepa*.

## Abstract

---

The genotoxic and cytotoxic potential of ethanolic extracts of two local medicinal plants; *Clematis flammula* and *Cistus albidus* were evaluated using *Allium cepa* test. The extracts have been tested at 50µg/ml, 100µg/ml and 300µg/ml, sodium azide was used as a positive control at 25 µg/ml, 50µg/ml, 100µ /ml, distilled water and DMSO as negative controls. The results obtained show that the ethanolic extracts of *C.flammula* and *C.albidus* are slightly cytotoxic at low concentrations (50 et 100µg/ml), while a higher concentration (300µg/ml) is highly cytotoxic, these extracts do not induce anticytotoxic effect against the cytotoxicity of sodium azide. The percentages of aberrations observed after treatment with the extract of *C. flammula* are significantly elevated compared to negative controls, this indicates that this extract is genotoxic at the concentrations tested. The chromosomal aberration rate observed during treatment with the combination with sodium azide/ plant extracts are lower than the positive control, indicating that the extracts have antigenotoxic action.

**Keywords:** *C.flammula*, *C.albidus*, genotoxicity, cytotoxicity, *Allium cepa*.