

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI TIZI OUZOU**  
**FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



**Mémoire de fin d'études**  
**En vue de l'obtention du diplôme**  
**De MASTER**  
**En sciences Biologiques**  
**Option : Biochimie Appliquée**

**Thème**

**Effet antimittotique et cytotoxique des alcaloïdes et d'extrait aqueux des  
feuilles de *Verbascum sinuatum* L.**

**Rédigé par :**

**AMARI THANINA**

**OUARAB KENZA**

**Soutenu le : 14/07/2019**

**Devant le jury composé de :**

<b>HOUALI KARIM</b>	<b>Professeur</b>	<b>UMMTO Président</b>
<b>AICHE-IRATNI GHENIMA</b>	<b>Maitre de conférence B</b>	<b>UMMTO promotrice</b>
<b>OUZID YASMINA</b>	<b>Docteur</b>	<b>UMMTO Co-promotrice</b>
<b>BARIZ KARIM</b>	<b>Maitre Assistant A</b>	<b>UMMTO Examineur</b>

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018/2019**

## Remerciements

- ❖ Nous tenons à remercier notre promotrice Mme AICHE-IRATNI G. pour l'encadrement qu'elle nous a prodigué tout le long de ce travail, pour ses conseils, ses remarques et ses explications. Que ce modeste travail vous honore et vous témoigne notre reconnaissance.
- ❖ On tient à exprimer notre gratitude et notre reconnaissance envers notre Co-promotrice Mme OUZID Y. pour ces encouragements, sa patience, ses conseils et son soutien.
- ❖ Nos remerciements vont au professeur Mr HOUALI K. de nous avoir accueilli dans son laboratoire et l'honneur qu'il nous fait d'être président du jury.
- ❖ On remercie également Mr BARIZ K. d'avoir accepté d'être membre du jury.
- ❖ On tient également à remercier Mme RABEHI H. l'ingénieur du laboratoire.
- ❖ On remercie aussi tout le personnel de laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB).

## **Dédicaces**

A mes très chers parents

A mes sœurs et à mes beaux frères, votre soutien moral m'a toujours été d'un grand secours dans les moments les plus difficiles

A mes frères et ma belle sœur

A tous mes neveux et à toutes mes nièces.

A toute ma famille.

A toutes mes amies et à tous ceux qui me sont chers.

Thanina

## Dédicaces

A mes chers parents qui m'ont encouragé à être ce que je suis, avec tant d'amour

A mes chers frères et mes sœurs pour leurs encouragements

A tous mes amis

kenza

# Plan

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction. .... 1

## Partie bibliographique

Chapitre I : Présentation de genre *Verbascum* ..... 2

1.1. Usage traditionnel ..... 2

1.2. Présentation de l'espèce *Verbascum sinuatum* L ..... 3

1.3. Etude phytochimique..... 4

1.3.1. Les alcaloïdes ..... 4

1.3.1.1. Définition ..... 4

1.3.1.2. Classification ..... 5

1.3.1.3. Les alcaloïdes du genre *Verbascum* ..... 5

1.3.2. Les polyphénols..... 6

1.3.3. Les terpénoïdes..... 7

Chapitre II : Le cycle cellulaire..... 9

2.1. L'interphase..... 9

2.2. La mitose ..... 10

2.3. Rôle des microtubules dans le cycle cellulaire et la mitose ..... 11

2.4. Activités biologiques des métabolites secondaires ..... 13

2.4.1. Les composés antimitotiques ..... 13

2.4.1.1. Les inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules ..... 13

2.4.1.2. Les inhibiteurs de la polymérisation des microtubules ..... 13

2.4.1.2.1. Les vinca-alcaloïdes ..... 14

2.4.1.2.2. La colchicine ..... 14

2.4.1.2.3. Les podophyllotoxines .....	15
Chapitre III : Effet des métabolites secondaires sur la membrane érythrocytaire .....	16
3.1. Globules rouges .....	16
3.2. La membrane érythrocytaire .....	16
3.3. Hémolyse physiologique .....	17
3.3.1. L'effet de la saponine sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire .....	17
<b>Partie expérimentale</b>	
1. Matériel et méthodes .....	18
1.1. Matériel .....	18
1.1.1. Matériel biologique .....	18
1.1.2. Appareillages .....	18
1.1.3. Réactifs et solvants .....	19
1.2. Méthodes .....	20
1.2.1. Extraction de la fraction d'alcaloïdes .....	20
1.2.2. Extraction aqueuse de la poudre de feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L .....	21
1.2.3. Evaluation de l'effet antimittotique .....	21
1.2.4. Dosage des alcaloïdes .....	23
1.2.5. Dosage des flavonoïdes .....	24
1.2.6. Evaluation de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L. sur la membrane érythrocytaire .....	25
1.2.7. Etude statistique .....	26
2. Résultats et discussion .....	27
2.1. Evaluation de l'activité antimittotique .....	27
2.1.1. Paramètres mitotiques .....	27
2.1.1.1. Indice de phases et indice mitotiques .....	27
2.1.1.2. Indice d'aberration et anomalie de la division cellulaire .....	28

2.1.1.3.La valeur limite de cytotoxicité (VLC) .....	32
2.2. Dosage des alcaloïdes.....	33
2.2.Dosage des flavonoïdes .....	34
2.3.Effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L.sur la membrane érythrocytaire .....	34
Conclusion et perspectives .....	36
Références bibliographiques .....	37
Annexes	

## Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Aspects morphologiques de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	3
2	Fleurs et fruits de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	3
3	Structure de la verbacine	6
4	Les différentes phases du cycle cellulaire	11
5	Assemblage des microtubules	12
6	Structure générale des vinca-alcaloïdes	14
7	Structure de la colchicine	15
8	Structure de la podophyllotoxine	15
9	Structure de la membrane érythrocytaire	16
10	Structure de la saponine	17
11	Extraction d'alcaloïdes de feuilles <i>Verbascum sinuatum</i> L.	20
12	Protocole de l'évaluation de l'effet antimitotique	21
13	Courbe étalon de la colchicine	23
14	Courbe étalon de la quercétine	24
15	Les différentes étapes du test d'évaluation de l'effet des échantillons sur la membrane érythrocytaire	26
16	Phases mitotiques normales observées dans les cellules méristématiques traitées par l'eau distillée (témoin -)	28
17	Les aberrations chromosomiques, cellulaires et nucléaires rencontrées dans les cellules méristématiques d'oignon suite au traitement avec la colchicine, vue sous microscope optique (X400)	29
18	Les aberrations observées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par la fraction d'alcaloïdes de feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L., vue sous microscope optique (X400)	30
19	Les aberrations observées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par l'extrait aqueux de feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L., vue sous microscope optique (X400)	30

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Intitulé</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Les principaux composés phénoliques de <i>Verbascum</i>	<b>7</b>
<b>2</b>	Les terpénoïdes les plus fréquents chez <i>Verbascum</i>	<b>8</b>
<b>3</b>	Réactifs et solvants utilisés	<b>19</b>
<b>4</b>	Indices mitotiques et indices de phases	<b>27</b>
<b>5</b>	Indices d'aberrations rencontrées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par la colchicine et les différents échantillons	<b>32</b>
<b>6</b>	Valeurs limite de cytotoxicité des échantillons de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	<b>33</b>
<b>7</b>	Densités optiques et pourcentage d'hémolyse des témoins et des échantillons	<b>35</b>

## Résumé

Les plantes médicinales constituent une source importante de molécules bioactives ayant des activités biologiques très intéressantes (anticancéreuse, hémostatique...). Parmi ces molécules, on compte la famille des alcaloïdes. C'est pour cela qu'il nous a paru intéressant d'étudier l'activité antimittotique et cytotoxique de ces métabolites secondaires contenus dans la fraction et l'extrait aqueux de feuilles de *Verbascum sinuatum* L.. L'activité antimittotique est évaluée par le test d'*Allium cepa* sur des cellules méristématiques par le calcul des paramètres mitotiques. La détermination de l'indice mitotique a révélé des perturbations de la division cellulaire avec une différence hautement significative entre le témoin négatif (eau distillée) et les différents échantillons. Nous avons constaté également que l'exposition des cellules méristématiques à nos échantillons a engendré un grand nombre d'aberrations chromosomiques, nucléaires et cellulaires avec un indice d'aberration atteignant  $27,09 \pm 3,67\%$ . Par l'analyse de la valeur limite de cytotoxicité, on considère nos échantillons comme composés sublétaux. Quand au dosage colorimétrique des alcaloïdes à partir de la courbe d'étalon de colchicine pris comme standard a confirmé la richesse des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. en ce composé bioactif. En ce qui concerne l'effet de la fraction d'alcaloïdes et d'extrait aqueux sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire est évalué par la détermination du pourcentage d'hémolyse. Ce dernier a montré que la fraction d'alcaloïdes présente un effet hémolytique faible comparativement à celui de l'extrait aqueux.

**Mots clés :** *Verbascum sinuatum* L., alcaloïdes, extrait aqueux, *Allium cepa*, activité antimittotique, activité cytotoxique.

## Summary

Medicinal plants are an important source of bioactive molecules with very interesting biological activities (anticancer, haemostatic...). Among these molecules is the alkaloid family. This is why it seemed interesting to us to study the antimitotic and cytotoxic activity of these secondary metabolites contained in the fraction and aqueous extract of leaves of *Verbascum sinuatum* L. The antimitotic activity is evaluated by the *Allium cepa* test on meristematic cells by calculating the mitotic parameters. The determination of the mitotic index revealed disruptions in cell division with a highly significant difference between the negative control (distilled water) and the different samples. We also found that exposure of meristematic cells to our samples resulted in a large number of chromosomal, nuclear and cellular aberrations with an aberration index reaching  $27.09 \pm 3.67\%$ . By analyzing the cytotoxicity limit value, our samples are considered as sublethal compounds. As for the colorimetric determination of alkaloids from the colchicine standard curve taken as standard confirmed the richness of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. in this bioactive compound. With regard to the effect of the fraction of alkaloids and aqueous extract on the integrity of the erythrocyte membrane is assessed by determining the percentage of hemolysis. The latter showed that the alkaloid fraction has a low hemolytic effect compared to the aqueous extract.

**Key words** : *Verbascum sinuatum* L., alkaloid, aqueous extract, *Allium cepa*, antimitotic activity, cytotoxic activity.

## ملخص

تشكل النباتات الطبية مصدرًا مهمًا للجزيئات النشطة حيويًا التي لها أنشطة بيولوجية مثيرة جدًا للاهتمام (مضادة للسرطان، انحلال الدم). ومن بين هذه الجزيئات، نجد عائلة القلويدات. لذلك أهتمنا بدراسة النشاط المضاد للانقسام غير المباشر في الخلية والنشاط السام لهذه المستقلبات الثانوية الموجودة في الجزء والمستخلص المائي لأوراق آذان الدب. يتم تقييم النشاط المضاد للانقسام غير المباشر في الخلية عن طريق إختبار البصل على خلايا الأنسجة الإنشائية بحساب المعايير الانقسامية. وكشف تحديد المؤشر الانقسامي عن اضطرابات في الانقسام الخلوي مع وجود فرق كبير للغاية بين الشاهد السالب (الماء المقطر) والعينات المختلفة. لقد لاحظنا أيضًا بأن تعريض خلايا الأنسجة الإنشائية لعيناتنا نتج عنه عددًا كبيرًا من إنحرافات كروموزومية نووية و خلوية بمؤشر انحراف بلغ  $27.09 \pm 3.67\%$ . وبتحليل القيمة القصوى للسمية الخلوية، نعتبر عيناتنا كمركبات شبه مميتة. وفيما يخص المعايير المسعارية للقلويدات وإنطلاقًا من منحنى عيار الكولشيسين الذي أُخذ كمعيار فإنه أثبت غنى أوراق آذان الدب بهذا المركب الحيوي. وفيما يتعلق بتأثير جزء من القلويدات والمستخلص المائي على تماسك غشاء كريات الدم الحمراء فإنه يتم تقييمه من خلال تحديد النسبة المئوية لانحلال الدم. وقد أظهرت هذه الأخيرة أنّ جزء من القلويدات له تأثير انحلالي أقل بالمقارنة إلى تأثير المستخلص المائي.

### كلمات البحث:

آذان الدب، قلويدات، مستخلص مائي، إختبار البصل، نشاط مضاد للانقسام غير المباشر في الخلية، نشاط سام.

# Introduction

---

Les plantes médicinales sont largement utilisées dans le monde entier en médecine traditionnelle, car elles constituent toujours le principal fournisseur de nouveaux médicaments et de nouvelles structures chimiques malgré la découverte de nouveaux composés en chimie de synthèse. Nous assistons donc à un regain de la phytothérapie surtout pour les produits riches en substances bioactives (KUREK-GORECKA et *al.*, 2013). À cet égard, plusieurs résolutions ont été adoptées afin de répondre au regain d'intérêt suscité par l'usage des plantes médicinales et comprendre ainsi certaines de leurs propriétés phytothérapeutiques préconisées par nos ancêtres (NOSTRO et *al.*, 2002 ; DJERIDANE et *al.*, 2005).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire en plus des métabolites primaires des substances bioactives dites métabolites secondaires. Ces dernières sont produites par les plantes pour se protéger contre les prédateurs et les pathogènes, mais constituent aussi un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique possédant un large éventail d'activités biologiques. C'est le cas par exemple des alcaloïdes qui sont utilisés en thérapie comme antioxydants, antibactériens, antiulcéreux et anticancéreux (HADDOUCHI et *al.*, 2006). Ces composés conduisent aux développements de nouveaux produits puissants qui inhibent la progression de plusieurs maladies comme les tumeurs (AKINBORO et *al.*, 2007). Un criblage des plantes ayant une activité antimittotique pourrait donc ouvrir des perspectives nouvelles dans la recherche fondamentale sur le cancer dans le monde.

Afin de contribuer à la valorisation des plantes médicinales réputées pour leurs vertus thérapeutiques, ce travail vise à étudier l'activité antimittotique de la fraction d'alcaloïdes ainsi que l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur les cellules méristématiques d'oignon (*Allium cepa*) et leurs effets sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire.

**Partie  
bibliographique**

# Partie bibliographique

---

## Chapitre I : Présentation du genre *Verbascum*

Mieux connues sous les noms « Molène » ou « Bouillon », généralement additionnés d'un adjectif (noire, blanc,...). Les espèces du genre *Verbascum* font partie de la famille Scrophulariaceae. Ce genre compte plus de 360 espèces et de nombreux hybrides (QUEZEL et SANTA, 1963). De nombreuses espèces sont originaires de la région méditerranéenne, certaines sont du nord et du centre de l'Asie. Ce sont des plantes herbacées, généralement robustes, de grande taille, leur hauteur moyenne étant comprise entre 80 et 200 cm. Les fleurs sont disposées en épis ou en grappes. La corolle, composée de cinq pétales presque égaux entre eux, jaunes ou blanches. Le calice est constitué de cinq lobes égaux. Toutes les fleurs des espèces du genre *Verbascum* possèdent cinq étamines : trois supérieures courtes et deux inférieures longues. L'observation des poils laineux présents sur les filets des étamines, est un critère important dans la détermination des espèces. Le fruit se présente sous forme d'une capsule, plus ou moins globuleuse selon les espèces. Les feuilles du genre *Verbascum* sont alternes, généralement dentées irrégulièrement (GASTON, 1986).

### 1.1. Usage traditionnel

Les espèces appartenant au genre *Verbascum* sont très utilisées en phytothérapie. Ainsi les molènes de type bouillon blanc (*Verbascum thapsus* L. et *Verbascum blattaria* L.) sont connues depuis très longtemps pour leurs effets bénéfiques sur le système respiratoire (la toux, les bronchites et les extinctions de voix). On les emploie aussi pour calmer l'irritation des muqueuses (POLETTI, 1988).

Les feuilles, racines et fleurs de *Verbascum sinuatum* L. sont utilisées contre les maladies oculaires. Elles présentent aussi des activités antiseptique, antispasmodique et analgésique.

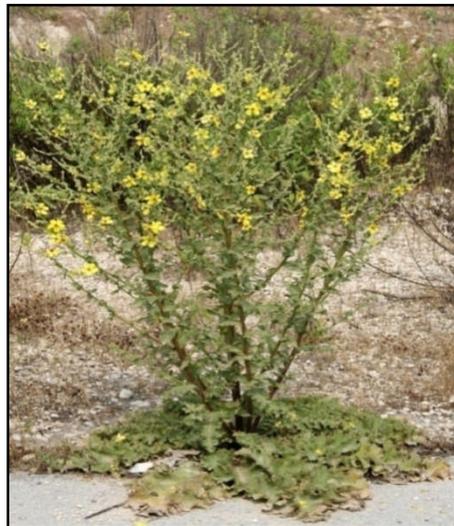
*Verbascum nigrum* L. ou molène noire constitue un remède doté d'une action prononcée sur l'oreille, sur les voies respiratoires et la vessie en calmant les irritations bronchiques et urinaires ainsi que la toux. Beaucoup d'autres espèces du genre *Verbascum* sont utilisées dans la médecine traditionnelle (KOSCH, 1939).

# Partie bibliographique

---

## 1.2. Présentation de l'espèce *Verbascum sinuatum* L.

La Molène à feuilles sinuées (*Verbascum sinuatum* L.) est une plante caractéristique surtout par ses feuilles basales énormes, ondulées et souvent très poilues (plante à rosette) (Figure1). Cette molène pousse partout à basse altitude car elle aime la chaleur, c'est une plante de la région méditerranéenne. Cette plante herbacée vivace peut atteindre 2 m de hauteur, la tige porte de nombreux rameaux fleuris, couverte de minuscules poils rassemblés en petits groupes. Les feuilles supérieures sont sessiles. Les fleurs sont jaune soufre avec des étamines violettes. Le fruit est une capsule portant plusieurs graines (MOSSERAY, 1935) (Figure 2).



**Figure 1:** Aspects morphologiques de *Verbascum sinuatum* L. (PAUME, 2007).



**Figure 2 :** Fleurs et fruits de *Verbascum sinuatum* L. (TISON et FOUCAULT, 2014).

## Partie bibliographique

---

La classification de l'espèce *Verbascum sinuatum* L. est donnée ci-dessous selon STOODEH (2015).

<b>Super-embranchement</b>	Spermatophyta
<b>Embranchement</b>	Angiospermae
<b>Classe</b>	Eudicotyledonae
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Scrophulariaceae
<b>Tribu</b>	Verbasceae
<b>Genre</b>	<i>Verbascum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Verbascum sinuatum</i> L.

### 1.3. Composition phytochimique

Il est connu que les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires constitués de protéines, glucides et lipides. Ces composés interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la défense contre les prédateurs et les pathogènes. Ces substances ne participent pas directement au processus de base de la cellule vivante contrairement aux métabolites primaires (YARNELL, 2007).

Chez le genre *Verbascum*, ces composés secondaires regroupent plusieurs molécules, généralement rassemblées en superfamilles chimiques : les alcaloïdes, les polyphénols et les terpénoïdes (NEWMAN, 2012).

#### 1.3.1. Les alcaloïdes

##### 1.3.1.1. Définition

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes (mais on les trouve également chez quelques animaux) et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basiques (MANN et *al.*, 1994 ; HARBONE et HERBET, 1995). Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies

## Partie bibliographique

---

biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés (HARBONE et HERBET, 1995 ; DEWICK, 2001).

Les alcaloïdes sont caractérisés par une solubilité faible dans l'eau et forte dans l'alcool, leur saveur est amère. Ils ont un caractère basique qui dépend de la disponibilité du doublet d'azote, par conséquent ils forment des sels avec les acides (organiques et minéraux) (MAURO, 2006).

### 1.3.1.2. Classification

La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, L'ornithine, la lysine, l'aspartate, l'antranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés (CYRIL, 2001). On divise les alcaloïdes en trois genres :

- **les alcaloïdes vrais** : Sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (BADIAGA, 2011) ;

- **les pseudo-alcaloïdes** : Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés d'acides aminés. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (RAKOTONANAHARY, 2012) ;

- **les proto-alcaloïdes** : Sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés à partir d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » (RAKOTONANAHARY, 2012).

### 1.3.1.3. Propriétés pharmacologiques

Les alcaloïdes présentent des activités pharmacologiques très intéressantes :

#### **Sur le système nerveux**

Dépresseur (morphine et scopolamine), stimulant (caféine, strychnine), gonglioplégique (nicotine).

#### **Au niveau vasculaire**

Hypertenseurs (éphédrine, hydrastine), hypotenseur (yohimbine), la vincamine améliore la circulation cérébrale.

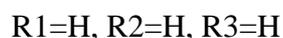
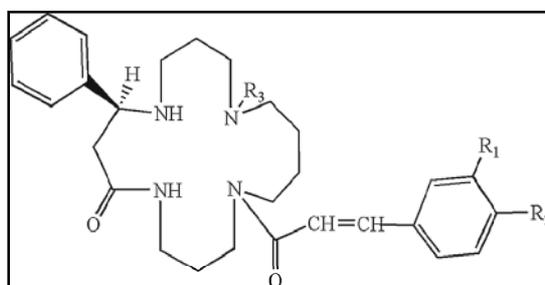
# Partie bibliographique

## Autres actions

Curarisant et anesthésiques locaux (cocaïne), anti-fibrillants (quinidine), anti-tumoraux (vinblastine, ellipticine), antipaludique (quinine), amoebicides (émétines).

### 1.3.1.4. Les alcaloïdes du genre *Verbascum*

Les alcaloïdes dérivant de la spermine sont les plus fréquemment rencontrés dans le genre *Verbascum*, ils sont en général des composés présentant un squelette macrocyclique. Ils sont aussi caractérisés par la présence d'un lien amide dans la totalité des composés recensés à ce jour. Ils peuvent aussi comporter un ou plusieurs substituants, soit sur un atome d'azote, soit sur un atome de carbone du cycle. La verbacine (Figure 3) constitue un exemple de ce type d'alcaloïdes (BAKKALI, 1997).



**Figure 3** : Structure de la verbacine (ALIPIEVA et *al.*, 2014).

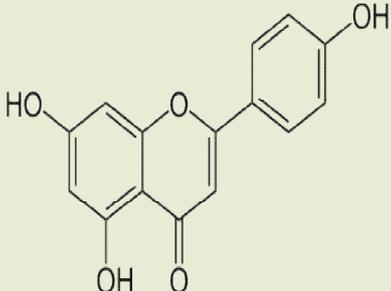
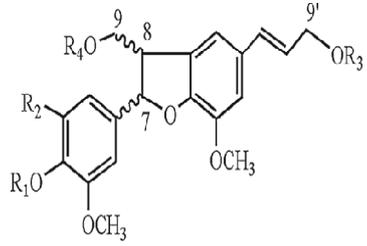
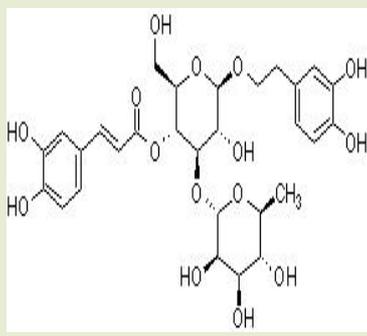
### 1.3.2. Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules (NKHILI, 2009). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (BRUNETON, 2015).

Les principaux composés phénoliques du genre *Verbascum* sont représentés dans le tableau suivant :

## Partie bibliographique

**Tableau I** : Les principaux composés phénoliques de *Verbascum*.

Composés	Structures chimiques	Références
<b>Apigénine</b>		(TATLI et AKDEMIR, 2004)
<b>Dehydrodiconiferyl- alcool-9-o-β-D- glucopyranoside</b>	 <p style="text-align: center;">R1=H, R2=H, R3=H, R4=GLc</p>	
<b>Verbascoside</b>		

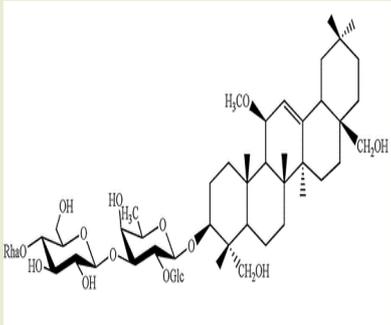
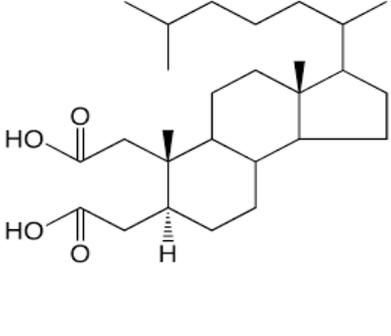
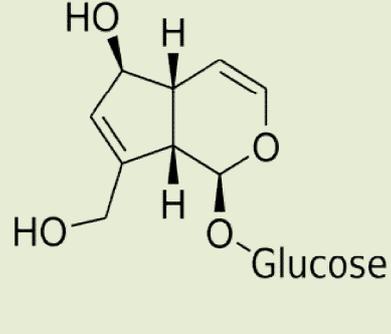
### 1.3.3. Terpénoïdes

Ce sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone appelé hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte (MANITO, 1981 ; DEY et HARBONE, 1991 ; BRUNETON, 1999).

Le tableau II englobe les types les plus fréquents de terpénoïdes chez *Verbascum* :

## Partie bibliographique

**Tableau II** : Les terpénoïdes les plus fréquents chez *Verbascum*.

Composés	Structures chimiques	Références
<b>Verbascosaponine</b>		(TATLI, 2007)
<b>5 <math>\alpha</math>- cholestane</b>		
<b>Aucubine</b>		(SHAHAT EMAM, 2010)

# Partie bibliographique

---

## Chapitre II : Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui constituent et délimitent la vie d'une cellule (VINCENT, 2007). Avant la division cellulaire, une cellule doit dupliquer son contenu, notamment son ADN. Ces phénomènes se produisent au cours de l'interphase. L'alternance de la mitose et de l'interphase est qualifiée de cycle cellulaire (JORDE et *al.*, 2004).

Le cycle cellulaire comprend :

- L'interphase ;
- La phase M ou mitose au cours de laquelle la cellule se divise pour donner naissance à deux cellules filles strictement semblables (MAILLET, 2002).

### 2.1. L'interphase

L'interphase est la période comprise entre la fin d'une division et le début de la division suivante, elle représente 90% du temps du cycle cellulaire (plus grande partie du cycle). L'interphase se décompose en une phase G1 (G: initiale de gap, intervalle), une phase S (synthèse) et une phase G2 ou prémitotique qui se succèdent dans l'ordre (MAILLET, 2002). La durée de cette phase non proliférative varie en fonction de la nature et des conditions physiologiques de la cellule (MAILLET et LEMULLOIS, 2006). La phase G1 vient d'un mot anglais "GAP" (intervalle) correspond à l'intervalle qui sépare la fin de mitose et de début de la synthèse de l'ADN. C'est une phase de croissance et de reconstitution des réserves pendant laquelle la cellule synthétise de l'ARN (transcription) et des protéines (traduction) (SWYNGHDAU, 2008). Tandis que la phase S est la phase de synthèse et de réplication de l'ADN et des histones (protéines basiques qui protègent l'ADN). Elle aboutit à une duplication du stock d'ADN de la cellule, qui passe de  $n$  chromosomes (haploïde) à  $2n$  chromosomes (diploïde). Dans la phase G2 qui précède la mitose, la cellule poursuit une activité transcriptionnelle pour la synthèse des substrats nécessaires à la mitose (VINCENT, 2007). Pendant cette phase, les centrosomes se répliquent, ils permettront le bon déroulement de la mitose (JORDE et *al.*, 2004).

# Partie bibliographique

---

## 2.2. La mitose

La mitose est la division cellulaire, sa durée est inférieure à une heure. Elle correspond à la mise en place du fuseau mitotique (CHEVRET, 2015). La mitose se déroule en quatre étapes reconnaissables morphologiquement, à savoir : prophase, métaphase, anaphase et télophase.

- **Prophase**

Elle est caractérisée par une condensation des chromosomes dans le noyau dont l'enveloppe existe en cours. Les chromosomes sont constitués par l'association de deux chromatides (SWYNGHDAU, 2008). Les microtubules s'organisent en fuseau tendu entre les deux centrosomes qui migrent vers chacun des pôles nucléaires. La prophase prépare la réplication des chromosomes (durée 15 à 30 min) (MAILLET, 2008).

- **Métaphase**

Elle est caractérisée par le regroupement des centromères dans le plan équatorial du fuseau de division. L'ensemble des chromosomes clivés, ainsi rangés, forme une figure appelée plaque équatoriale. Le fuseau est alors constitué par un ensemble de microtubules (MAILLET, 2008).

- **L'anaphase**

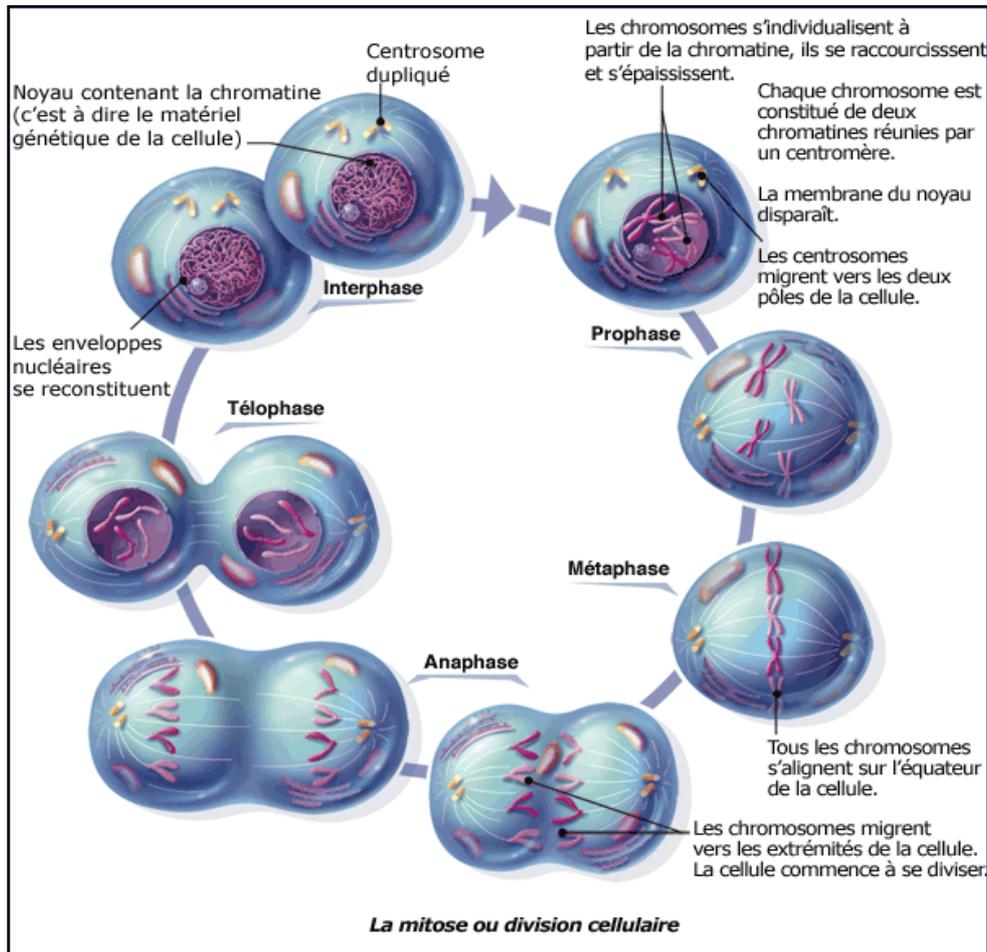
Elle correspond au partage des chromosomes en deux lots identiques. Elle est caractérisée par l'allongement des microtubules polaires, le raccourcissement des microtubules kinétochoriens et la migration des chromosomes vers les pôles mitotiques (GHORBAL, 2011).

- **Télophase**

Le terme « télophase » dérive du grec «telos» signifiant « fin ». Elle débute par l'arrêt de la migration des chromosomes qui se regroupent en éventail aux pôles cellulaires. Le fuseau mitotique va disparaître petit à petit, ensuite les deux lots de chromosomes se décondensent et reviennent à l'état de chromatine. Les fragments de réticulum endoplasmique s'assemblent pour former une enveloppe nucléaire. Lors de la télophase, les chromosomes se condensent et les deux noyaux-fils (chacun avec  $2n$ ) du noyau initial vont se former (SWYNGHEDAU, 2008).

# Partie bibliographique

Les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées dans la figure ci-dessous :



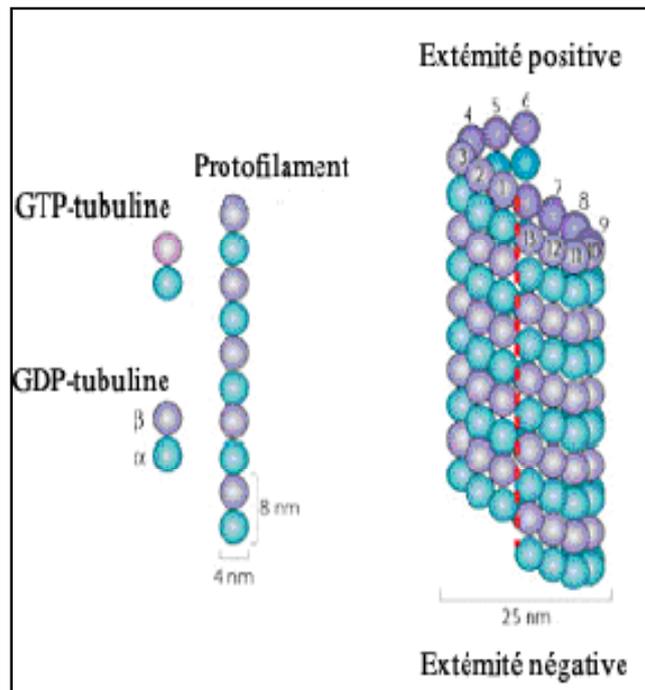
**Figure 4** : Les différentes phases du cycle cellulaire (VERONES, 2011).

### 2.3. Rôle des microtubules dans le cycle cellulaire et la mitose

Un microtubule est considéré comme une structure cylindrique de 25 nm de diamètre résultant d'une association latérale de 13 protofilaments : polymères polarisés et parallèles entre eux (CHRETIEN et FULLER, 2000 ; AMOS, 2004).

Sa paroi consiste en une suite hélicoïdale d'hétérodimères de tubuline, formés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ , arrangées en tête à queue ce qui confère une polarité intrinsèque aux microtubules, avec l' $\alpha$  tubuline à l'extrémité moins et la  $\beta$  tubuline à l'extrémité plus (VERONES, 2011) (Figure 5).

## Partie bibliographique



**Figure 5** : Assemblage des microtubules (AKHMANOVA, 2008).

La dynamique des microtubules est spécifiquement importante pour le propre attachement et le mouvement des chromosomes durant les stades variés de la phase mitotique (HOWARDHYMAN, 2003 ; BHATTACHARYYA, 2008). Les microtubules jouent un rôle essentiel dans la ségrégation des chromosomes durant la mitose. Ils ont de multiples fonctions lors de l'interphase, notamment dans le transport intracellulaire, la migration cellulaire et la différenciation (DESAI, 1997 ; VAN DER VAART *et al.*, 2009).

Les microtubules qui interviennent dans le fuseau mitotique sont dans un état de balance particulièrement délicat entre l'assemblage et le désassemblage de leur constituant tubulaire. La formation du fuseau et le mouvement de chacun des chromosomes vers chaque pôle du fuseau dépendent de la dynamique des microtubules (AMOS, 2004).

Au cours de la mitose, le réseau microtubulaire propre à l'interphase disparaît pour faire place au fuseau mitotique, élément indispensable à la répartition des chromosomes aux futures cellules filles et à la division de la cellule et c'est la tubuline des microtubules de l'interphase qui sert à construire ce fuseau (JORDAN, 1998).

Les microtubules possèdent un rôle primordial lors de la mitose grâce à la dynamique liée à la polymérisation de la tubuline. Si une substance interagit avec la tubuline ou les microtubules, la division cellulaire sera fortement perturbée voire bloquée (LEROUX, 2011).

# Partie bibliographique

---

## 2.4. Activités biologiques des métabolites secondaires

### 2.4.1. Les composés antimitotiques

Les substances antimitotiques sont des substances qui à faible concentration, sont capables d'inhiber la mitose, de la perturber ou de l'arrêter. Elles peuvent également perturber et inhiber un ou plusieurs phénomènes de la préparation à la mitose et ainsi d'empêcher la cellule d'entrer en cinèse (division) (CHEVREMONT, 1979).

#### 2.4.1.1. Les inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules

- **Les taxanes**

Ce sont des complexes structuraux et semi-synthétiques. Ils présentent une cytotoxicité par effet unique antimicrotubulaire.

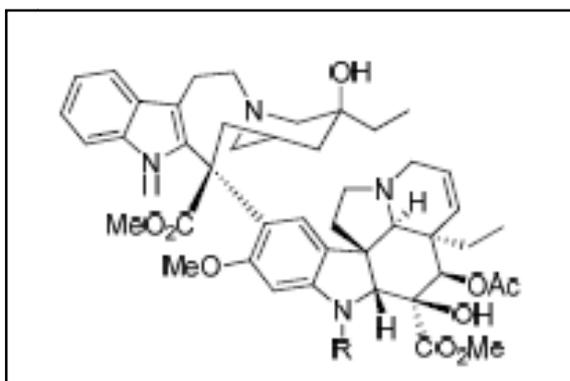
On retrouve parmi les molécules de cette famille le taxol qui se fixe dans une poche de  $\beta$  tubuline (AMOS, 2004). Le taxol va interférer avec la dynamique des microtubules en promouvant leur formation et en les stabilisant afin d'inhiber leur dépolymérisation. La stabilisation est accompagnée par des modifications structurales dans les microtubules, qui se traduisent notamment par une altération de la conformation des sous unités de la tubuline, ce qui retarde ainsi la dissociation de l'hétérodimère de tubuline (SCHIFF et HORWITZ, 1981 ; GROSIOS et *al.*, 1999).

Dans le cas de la mitose, le taxol bloque le cycle cellulaire en phase G2 ou M en inhibant le transport des chromosomes dans la cellule en division (AMOS, 2004 ; BHATTACHARYYA et *al.*, 2008).

#### 2.4.1.2. Les inhibiteurs de la polymérisation des microtubules

Contrairement aux taxanes, il existe des agents antimitotiques qui ont la capacité d'interférer avec les microtubules en inhibant leur polymérisation. C'est le cas des colchicinoïdes (colchicine et podophyllotoxine) ou des alcaloïdes de *Vinca*, tels que la vinblastine (1) ou la vincristine (2) (LEROUX, 2011) (Figure 6).

## Partie bibliographique



- 1 R=Me
- 2 R=CHO

**Figure 6** : Structure générale des vinca-alcaloïdes (GIGANT *et al.*, 2005).

### 2.4.1.2.1. Les vinca-alcaloïdes

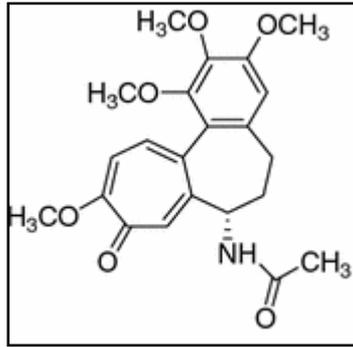
Les vinca-alcaloïdes sont des composés dimériques, ils induisent une cytotoxicité par interaction directe avec la tubuline (JONHSON *et al.*, 1963 ; DUSTIN, 1980) plus précisément de façon réversible sur la  $\beta$  tubuline, à l'extrémité positive des microtubules (NA et TIMASHEFF, 1986). Les vinca-alcaloïdes ont aussi de l'affinité pour l'hétérodimère de tubuline libre ce qui peut induire la formation de paracristaux de tubuline (agrégats cristallins) à très haute concentration (BRYAN, 1972 ; MANFREDI et HORWITZ, 1984 ; CORREIA et LOBERT, 2001). Les effets de ces procédés induisent le blocage de la polymérisation de la tubuline en microtubule, qui peut conduire à l'inhibition de processus cellulaires vitaux et la mort cellulaire.

### 2.4.1.2.2. La colchicine

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines charnues du colchique *Colchicum autumnale* L. (Figure 7). En se fixant sur une molécule de la tubuline, la colchicine empêche sa polymérisation en microtubules (ALLAIN, 2000). La colchicine présente une forte affinité à la tubuline soluble et forme un complexe tubuline - colchicine qui s'ajoute à l'extrémité des microtubules. Il est à noter que la colchicine seule ne peut pas se fixer directement aux microtubules (SHI *et al.*, 1998 ; BHATTACHARYYA *et al.*, 2008). Par cette fixation à la tubuline, la colchicine bloque la division cellulaire par désorganisation des microtubules.

## Partie bibliographique

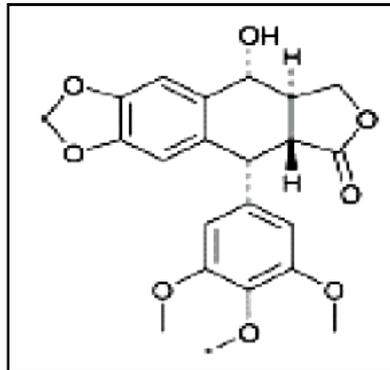
---



**Figure 7** : Structure de la colchicine (ALLAIN, 2000).

### 2.4.1.2.3. Les podophyllotoxines

La podophyllotoxine est extraite de *Podophyllum peltatum* L. qui fait partie de la famille des Podophyllaceae (CRAGG et al., 2005). L'effet inhibiteur est dû à sa fixation à la tubuline qui se traduit par la modification de la structure de cette protéine en la rendant impropre à la formation de microtubules (BABA- AISSA, 2000) (Figure 8).



**Figure 8** : Structure de la podophyllotoxine (HAIT et al., 2006).

# Partie bibliographique

## Chapitre III : Effet des métabolites secondaires sur la membrane érythrocytaire

### 3.1. Globules rouges

Les globules rouges sont de petites cellules anucléées, de forme biconcave contenant essentiellement l'hémoglobine qui assure le transport de l'oxygène et de dioxyde de carbone. Ces cellules mesurant  $7\mu\text{m}$  du diamètre et  $2\mu\text{m}$  d'épaisseur baignent dans le sang à une concentration d'environ 5 millions de cellules par  $\text{mm}^3$ . Ce nombre constant est le résultat d'un équilibre dynamique entre leur production dans l'os et leur élimination de la circulation sanguine à la fin de leur cycle de vie qui dure 120 jours. Pour assurer correctement sa fonction, le globule rouge doit à la fois être très résistant et facilement déformable. Ces propriétés sont données par sa membrane (GIRASOLE et *al.*, 2012).

### 3.2. La membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire est constituée d'une bicouche phospholipidique sous laquelle est encre un réseau bidimensionnel hautement organisé de protéine : le squelette. Ce dernier est constitué de longs filaments de spectrine reliés entre eux par des complexes de jonction qui sont principalement composés d'actine filamenteuse, de protéines 4.1 et de tropomyosines (Figure 9). Cette bicouche est également traversée de part en part par des protéines transmembranaires, telle que la bande 3 qui présente un antiport pour le passage des ions du chlore ( $\text{Cl}^-$ ) et les sialoglycoprotéines qui exposent à l'extérieur de la cellule des antigènes caractéristiques du groupe sanguin (LENORMAND, 2002).

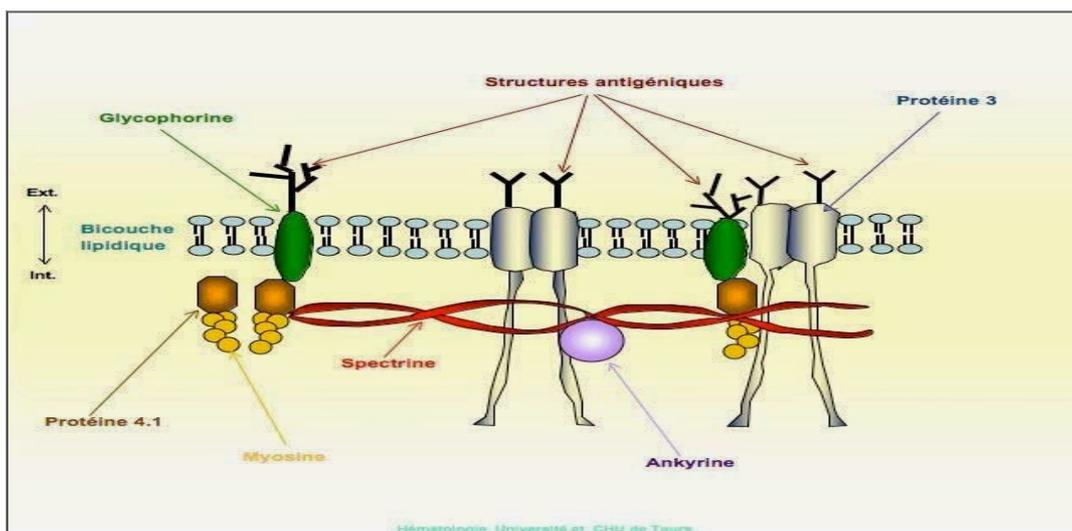


Figure 9 : Structure de la membrane érythrocytaire (JAUREGUIBERRY, 2015).

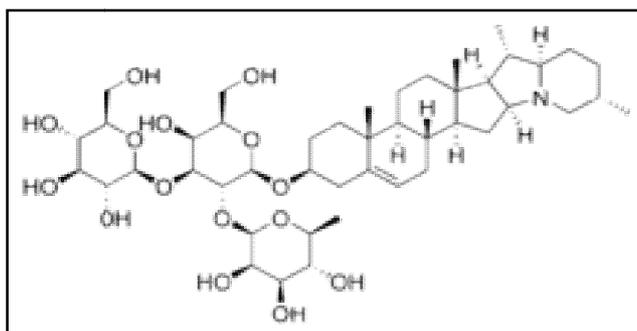
# Partie bibliographique

## 3.3. Hémolysse physiologique

L'hémolysse est un phénomène physiologique irréversible qui aboutit à la rupture de la membrane des hématies provoquant la libération des éléments intra-érythrocytaires dans le plasma notamment l'hémoglobine. Ce phénomène est détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans l'échantillon après centrifugation ou en mesurant la densité optique du surnageant (hémoglobine) par spectrophotométrie (MEZZOU *et al.*, 2006).

### 3.3.1. L'effet de la saponine sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire

Les saponines (Figure10) sont des molécules bioactives, connues pour leur capacité d'induire la formation des pores dans les membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolysse des globules rouges. Cette activité hémolytique est généralement expliquée par l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane cellulaire des érythrocytes en particulier le cholestérol, avec lesquelles elles forment des complexes insolubles (DAS *et al.*, 2012).



**Figure 10** : Structure de la saponine (ALAPIEVA *et al.*, 2014).

**Partie  
expérimentale**

# Partie expérimentale

---

## 1. Matériel et méthodes

L'objectif de cette étude est de tester l'activité antimétabolique et l'effet sur la membrane érythrocytaire de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) au sein de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Département de Biochimie-Microbiologie. Université Mouloud Mammeri.

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué :

- de feuilles de *Verbascum sinuatum* L. qui ont été récoltées au mois de mai 2017 de manière aléatoire. L'échantillonnage a été effectué à Addekar Asif El Hemmam, wilaya de Bejaia. Ces feuilles ont été nettoyées, puis séchées et broyées en une fine poudre. Le produit final est maintenu à température ambiante pour un usage ultérieur ;
- des racines de bulbes d'oignons (*Allium cepa*) ont été sélectionnées pour évaluer les anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires ainsi que les perturbations dans le cycle cellulaire ;
- du sang humain a été prélevé dans des tubes héparinés d'un sujet sain. Le culot sanguin contenant les globules rouges a été recueilli pour tester l'effet de la fraction d'alcaloïdes ainsi que l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur la membrane érythrocytaire.

#### 1.1.2. Appareillages

Pour notre étude on a fait recours principalement aux appareils suivants :

- un évaporateur rotatif pour éliminer les solvants ;
- un microscope optique pour observer les cellules méristématiques d'oignon ;
- un lyophilisateur qui a permis d'avoir nos lyophilisats ;
- un bain marie, une centrifugeuse et un spectrophotomètre utilisé lors des dosages.

## Partie expérimentale

Parmi la verrerie utilisée, une ampoule de décantation nous a permis d'obtenir la fraction d'alcaloïdes.

### 1.1.3. Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants utilisés lors de notre étude sont cités dans le tableau ci-dessous :

**Tableau III** : Réactifs et solvants utilisés.

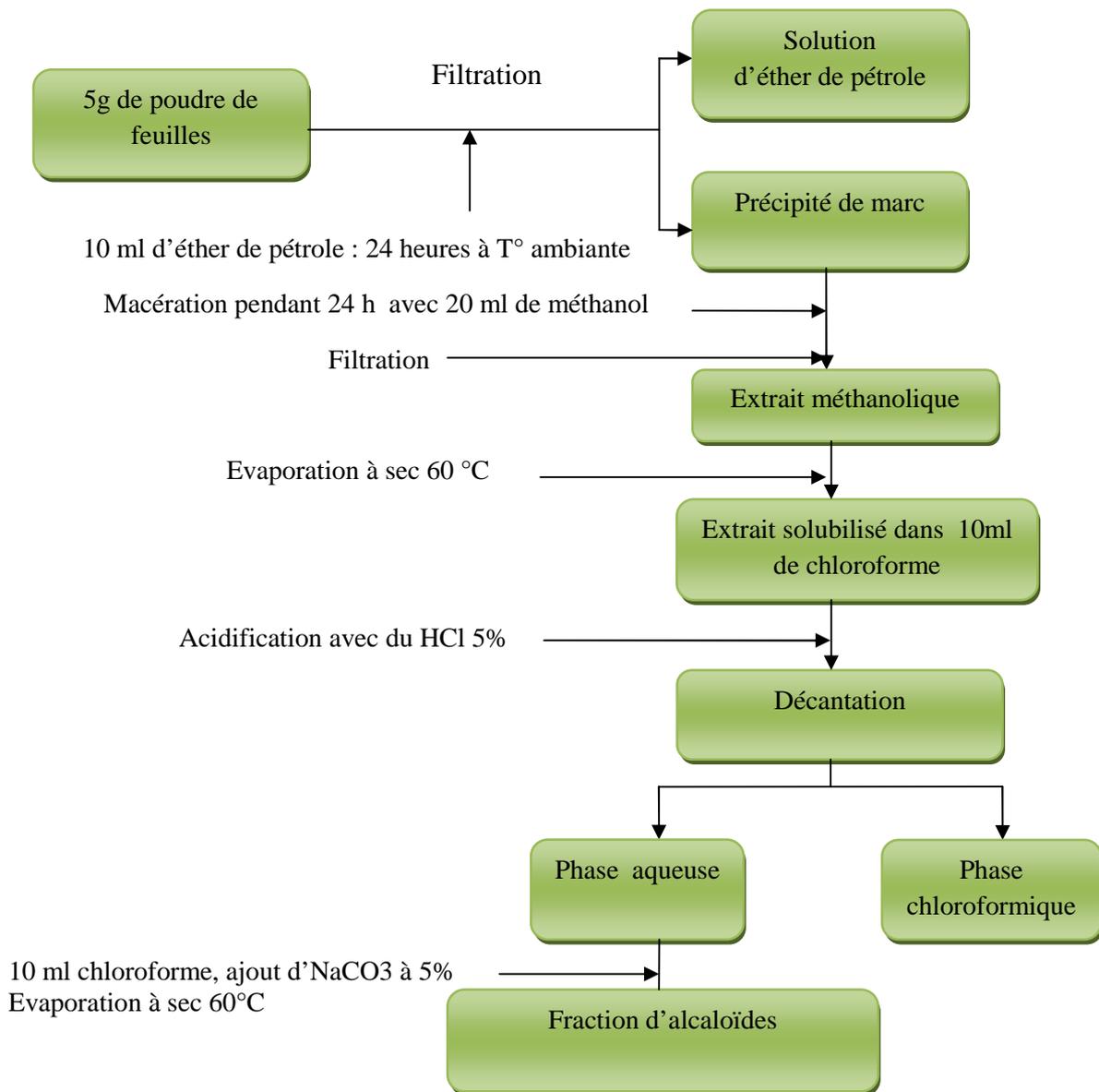
Composés	Concentrations	Rôles	Activités
- Carmin acétique	/	Solution de coloration	Antimitotique (alcaloïdes et flavonoïdes)
- Ethanol+acide acétique	V/V: 1/3(Alcool/Ac acétique)	Solution de fixation	
- Eau distillé	/	Témoin négatif	
- Colchicine	1mg/ml	Témoin positif	
-Carbonate de sodium	5%	Basification	
-Saponine	1mg/ml	Témoin positif (agent hémolytique)	Effet sur la membrane érythrocytaire
-Eau physiologique	9‰	Témoin négatif	
- Acide chlorhydrique	32%	Acidification	Dosage alcaloïdes et flavonoïdes
-Chlorure ferrique	5%	Coloration	
-Chlorure d'aluminium	2 %	Coloration	
-Quercétine	1mg/ml	Standard	
- Ether de pétrole	Pur	Extraction	Extraction d'alcaloïdes
- Méthanol	99,7 %		
- Chloroforme	Pur		

# Partie expérimentale

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Extraction de la fraction d'alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir de la poudre de feuilles de *Verbascum sinuatum* L. est une extraction solide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin selon la figure ci-dessous suivant le protocole de HARBONE (1998) optimisé par nos soins.



**Figure 11** : Extraction d'alcaloïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. (HARBONE, 1998).

## Partie expérimentale

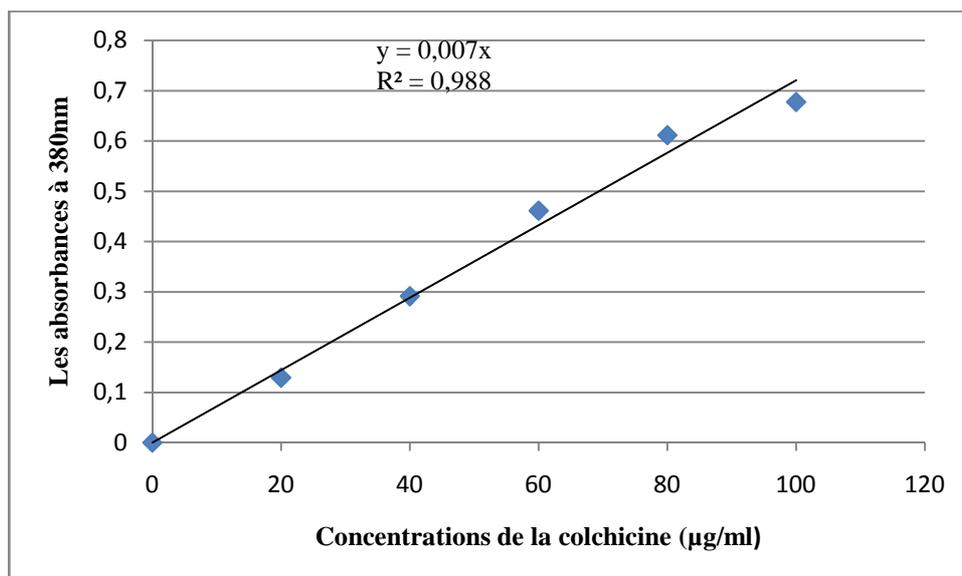
La fraction d'alcaloïdes a été récupérée avec de l'eau distillée pour étudier l'activité antimototique et avec de l'eau physiologique pour étudier l'effet de nos échantillons sur la membrane érythrocytaire.

### 1.2.2. Extraction aqueuse de la poudre de feuilles de *Verbascum sinuatum* L.

L'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a été préparé par macération de 10 g de poudre de feuilles dans 100 ml d'eau distillée pendant 24 heures. Après congélation et lyophilisation, l'extrait aqueux est conservé 4 °C à l'abri de la lumière.

### 1.2.3. Dosage des alcaloïdes

L'estimation de la teneur en alcaloïdes a été effectuée et déterminée par la méthode spectrophotométrique suivant le protocole de PATEL et *al* (2015) ; TABASUM et *al* (2016) optimisé par nos soins. Le principe du dosage repose sur la réaction des alcaloïdes avec le chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) et leur capacité à former des complexes colorés. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 380 nm est proportionnelle à la quantité des complexes formés dans la fraction végétale d'alcaloïdes et l'extrait aqueux de *Verbascum sinuatum* L.. Le dosage des alcaloïdes dans nos échantillons est basé sur l'utilisation d'une courbe étalon (Figure 13). Cette dernière est réalisée en utilisant la colchicine comme standard à différentes concentrations (10-100 µg/ml) (Annexe 1).



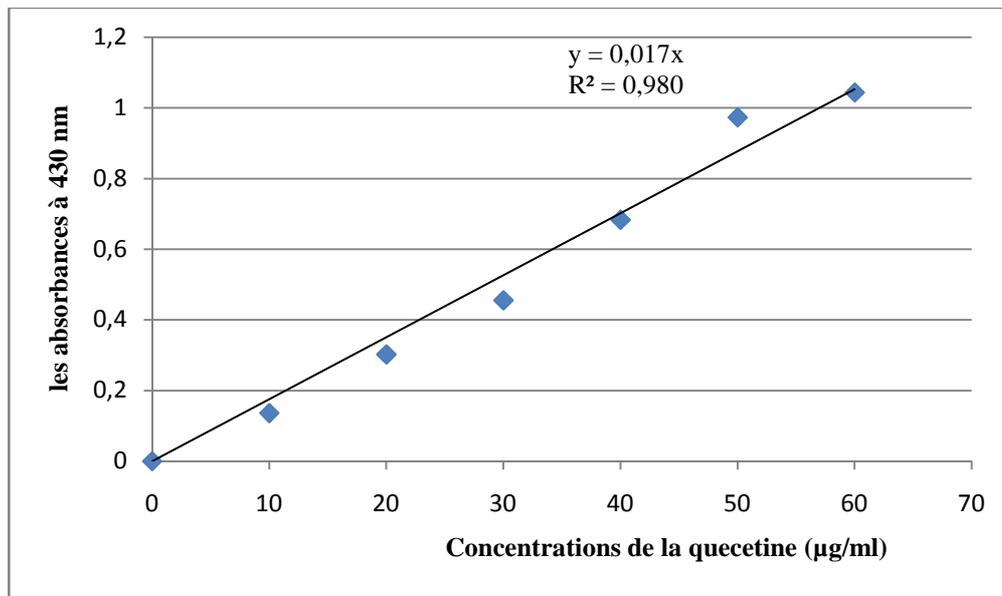
**Figure 13 :** Courbe étalon de la colchicine.

## Partie expérimentale

### 1.2.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. est effectué suivant le protocole de BAHORUN et *al* (1996).

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater les métaux (chlorure d'aluminium  $AlCl_3$ ) et de former ainsi un complexe de coloration jaunâtre. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 430 nm est proportionnelle à la quantité des complexes formés. La concentration des flavonoïdes ainsi déduite à partir d'une courbe d'étalonnage (Figure 14) réalisée par un standard représenté par la quercétine à différentes concentrations (10-60  $\mu\text{g/ml}$ ) (Annexe 1). Les densités optiques obtenues pour le dosage d'alcaloïdes ainsi que les flavonoïdes sont la moyenne de trois essais plus au moins une erreur standard.

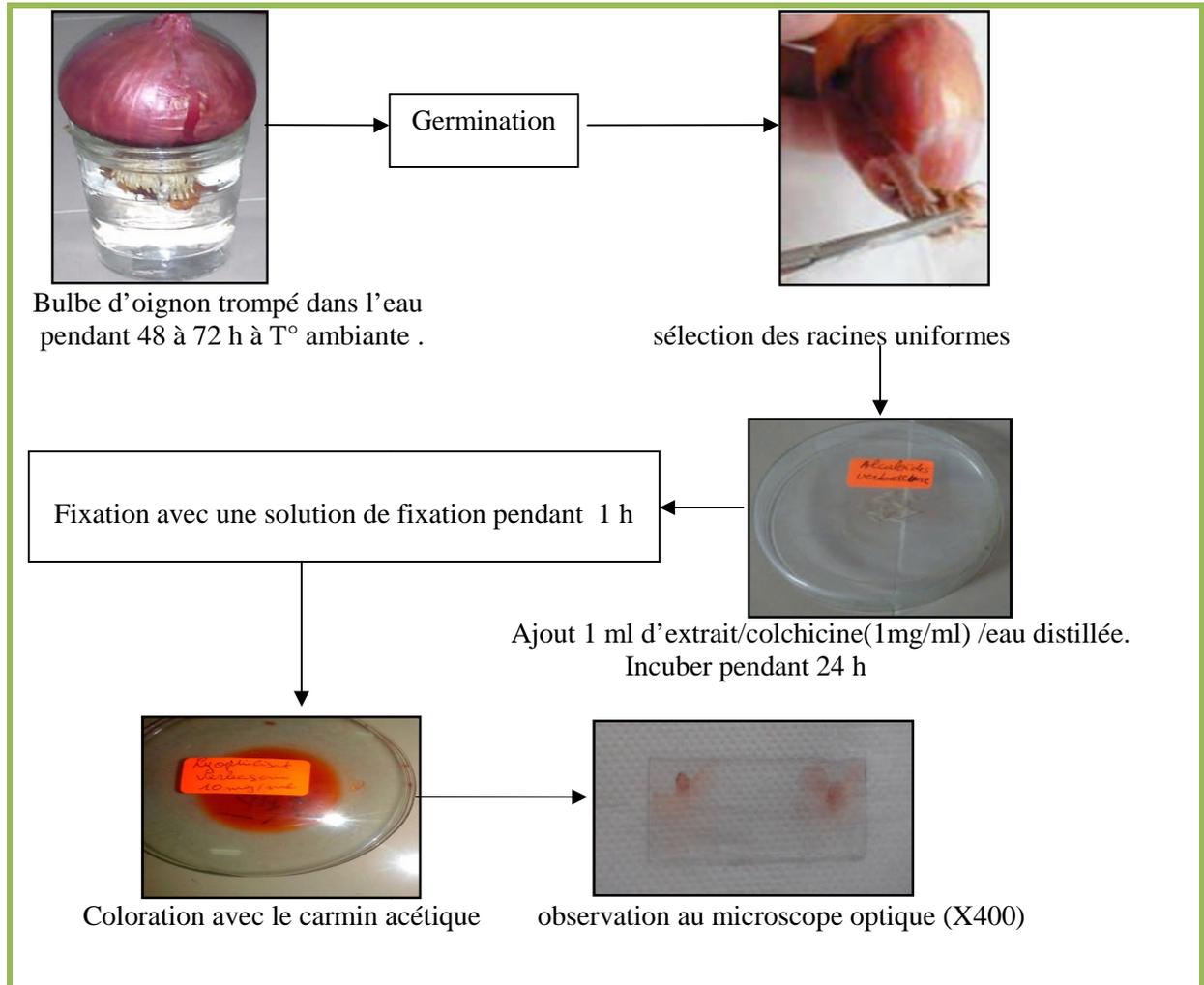


**Figure 14 :** Courbe étalon de la quercétine.

### 1.2.5. Evaluation de l'effet antimittotique

L'évaluation de l'activité antimittotique des alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a été réalisée par le test d'*Allium cepa* adopté par SHWETA et *al* (2012) optimisé par nos soins est représenté dans la figure suivante :

## Partie expérimentale



**Figure 12 :** Protocole de l'évaluation de l'effet antimitotique (SHWETA et *al.*, 2012).

Sur la base des observations microscopiques, nous avons déterminé différents paramètres mitotiques (pour chaque échantillon, 5 essais ont été réalisés plus au moins une erreur standard) à savoir :

- **Indice mitotique (IM)**

Cet indice consiste à comptabiliser le pourcentage des cellules arrêtées en mitose sur le total des cellules examinées (IKEDA et *al.*, 2000).

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules en division}}{\text{Nombre de cellules examinées (350 cellules)}} \times 100$$

## Partie expérimentale

- **Indice des phases (IP)**

Cet indice est calculé afin de déterminer le pourcentage des cellules dans chaque phase de la mitose (Prophase, Métaphase, Anaphase, Télophase) (GLINSKA *et al.*, 2007).

$$\text{IP (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellule en (P, M, A, T)}}{\text{Nombre de cellules examinées (350 cellules)}} \times 100$$

- **Indice des aberrations (IA)**

Les aberrations chromosomiques rencontrées sont de différents types :

AG : Agglutinations chromosomiques ; CB : Cellules binucléés ; AL : Allongement des cellules ; PC : Ponts chromosomiques ; FR : Fragmentation des chromosomes ;

DP : Désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase ; CG : Cellules gigantesques ;

CS: Cellules sans noyau ; CA: Corps apoptotiques ; AC: Absence de cytotière.

L'indice d'aberrations est calculé selon RACUCIU et CREANGA (2007) comme suit :

$$\text{IA (\%)} = \frac{\text{Total des aberrations chromosomiques}}{\text{Total des cellules examinées (350cellules)}} \times 100$$

- **Valeur limite de cytotoxicité (VLC)**

La Valeur limite de cytotoxicité est calculée selon ANTONSIE *et al* (1990) à partir de la formule suivante:

$$\text{VLC(\%)} = \frac{\text{IM des cellules traitées}}{\text{IM des cellules témoins}} \times 100$$

## Partie expérimentale

---

### 1.2.6. Evaluation de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur la membrane érythrocytaire

Le protocole suivi pour étudier l'effet de nos échantillons sur la membrane érythrocytaire est celui de DUCHNOWICZ (2012), en utilisant une suspension d'hématie à 2 % préparée à partir du sang frais qui a été prélevé d'un volontaire sain dans des tubes héparinés. Ensuite le sang est centrifugé à 2500 tours pendant 5 min. Après élimination du plasma, le culot est lavé trois fois avec de l'eau physiologique. Pendant chaque lavage, la suspension est centrifugée à 2500 tours pendant 5 min. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire des globules rouges est reconstitué sous forme de suspension à 2 % avec l'eau physiologique.

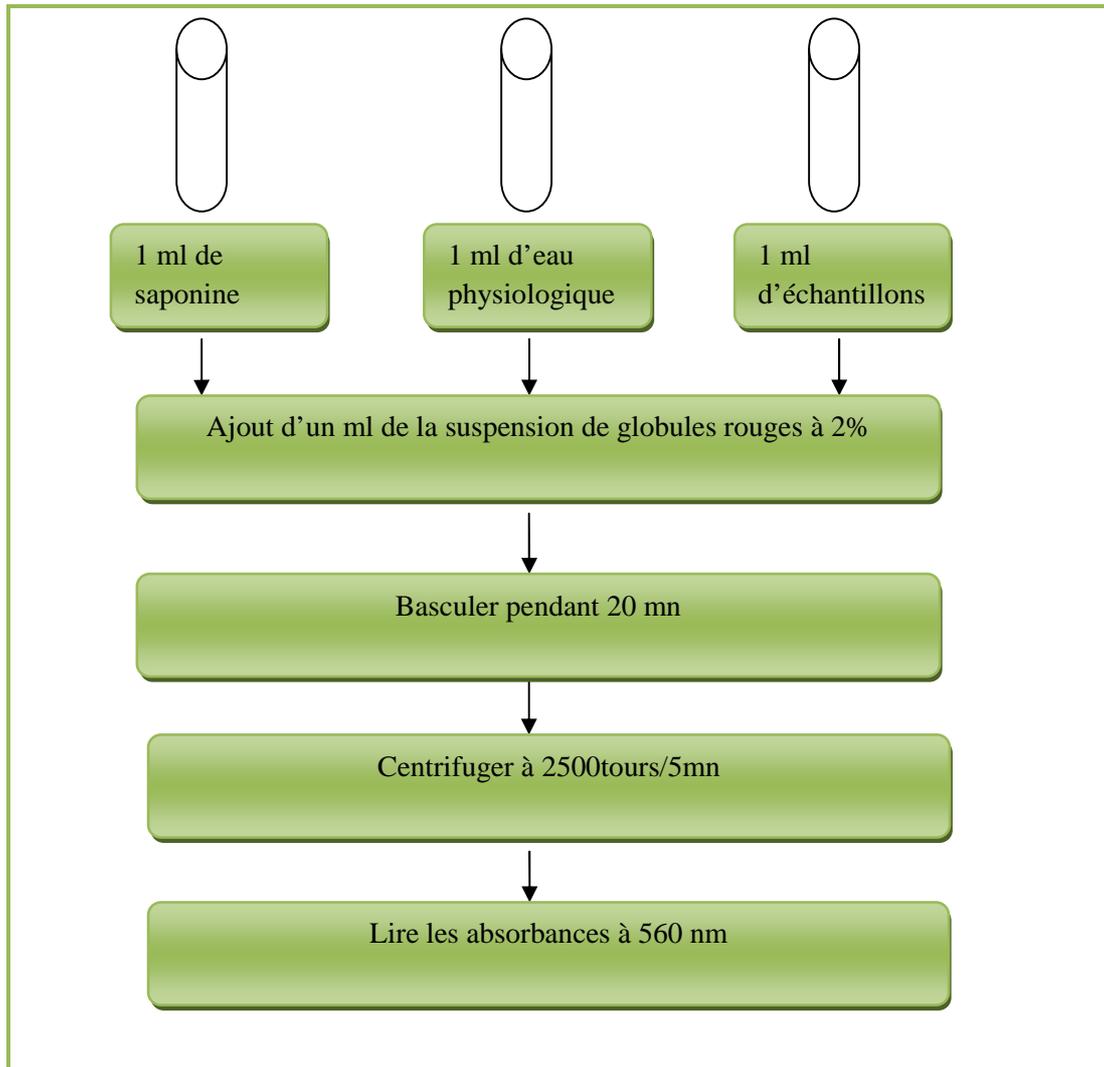
Après la mise en contact des échantillons et de la saponine (témoin positif), dilués dans l'eau physiologiques avec la suspension d'hématie à 2 %, nous avons déterminé leurs effets sur la membrane érythrocytaire par la mesure de la densité optique du surnageant à 560 nm (proportionnelle à la quantité d'hémoglobine libérée) et calculé le pourcentage d'hémolyse selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{DOe - DOb}{DOt+} \times 100$$

- DOe : DO de la suspension de globule rouge en présence de l'échantillon.
- DOb : DO de la suspension de globule rouge en présence de l'eau physiologique.
- DOT+ : DO de la suspension de globule rouge en présence de la saponine (1mg/ml).

## Partie expérimentale

Les principales étapes sont résumées dans la figure suivante :



**Figure 15 :** Les différentes étapes du test d'évaluation de l'effet des échantillons sur la membrane érythrocytaire (DUCHNOWICZ, 2012).

### 1.2.7. Etude statistique

Pour cette étude des analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test d'analyse de variance (ANOVA) à un facteur avec le logiciel STATISTICA, qui a pour principe de comparer le pourcentage d'indice mitotique, d'indice de phase, d'indice d'aberration et de la valeur limite de cytotoxicité entre les témoins, la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux.

# Partie expérimentale

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Evaluation de l'activité antimitotique

#### 2.1.1. Paramètres mitotiques

##### 2.1.1.1. Indice de phases et indice mitotiques

Après l'observation des échantillons sur le microscope optique, nous avons déterminé l'indice mitotique (IM) des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par le témoin négatif, le témoin positif (colchicine), la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) de feuilles de *Verbascum sinuatum* L.. L'indice de phase qui est l'autre paramètre calculé pour chaque phase de la mitose à savoir l'indice de prophase (P), l'indice de métaphase (M), l'indice d'anaphase (A) et l'indice de télophase (T) (Tableau IV).

**Tableau IV:** Indices mitotiques et indices de phases.

	IM±ES	P±ES	M±ES	A±ES	T±ES
<b>Témoin –</b>	92,20±1,34	82,91±3,07	0,62±0,39	0,96±0,35	7,98±3,52
<b>Témoin+</b>	35,00±1,16	32,28±1,73	0,11±0,05	0,28±0,13	2,85±0,70
<b>Fraction d'alcaloïdes</b>	33,00±2,33	32,16±2,41	0,05±0,04	0,00±0,00	0,91±0,47
<b>Extrait aqueux 4mg/ml</b>	42,20±2,44	40,96±1,93	0,00±0,00	0,00±0,00	1,59±0,76
<b>Extrait aqueux 10mg/ml</b>	31,00±2,50	32,45±3,43	0,00±0,00	0,00±0,00	1,02±0,40

Les cellules méristématiques traitées avec le témoin négatif ont l'indice mitotique le plus élevé (92,20±1,34%), comparativement à ceux calculés pour les cellules traitées avec de la colchicine (35,00±1,16%), La fraction d'alcaloïdes (33,00±2,33%) et l'extrait aqueux (31,00±2,50% et 42,20±2,44%). Des résultats similaires ont été rapportés en utilisant les extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* (OUZID et al., 2019). En parallèle nos échantillons ont donné des effets comparables pour chaque phase de la mitose. Il est a noté que l'indice de phases le plus élevé dans cet ensemble est celui qui correspond à la prophase (32,16±2,41% à 82,91±3,07%), contrairement aux autres stades de la division cellulaire qui sont minoritairement présents. Plusieurs auteurs ont également signalé dans leurs études un indice prophasique élevé (MEDJEBER et al., 2018).

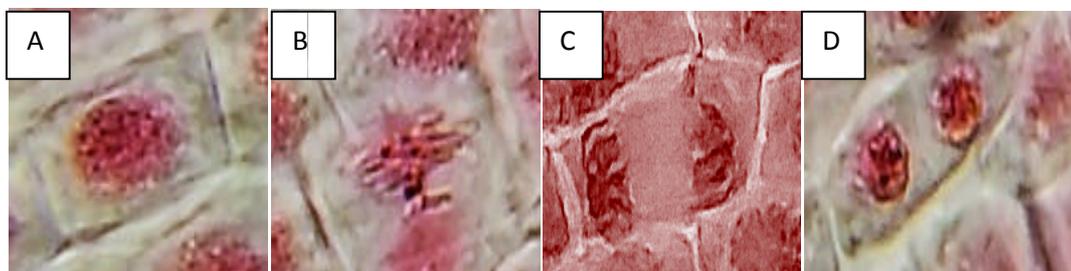
## Partie expérimentale

Le taux des anaphases des cellules méristématiques traitées par la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux est égal au taux des métaphases des cellules traitées par l'extrait aqueux (4 et 10 mg/ml) qui correspond à  $0,00 \pm 0,00$ . L'analyse statistique type ANOVA d'indice de phases n'a révélé aucune différence significative ( $p > 0,5$ ) entre les témoins (négatif et positif), la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) (Annexe 3).

L'indice mitotique est un paramètre fiable pour identifier les niveaux de cytotoxicité d'un agent chimique soit par son augmentation ou sa diminution (FERNANDES, 2007 ; LIMAN et *al.*, 2015). Nos échantillons ont nettement diminué cet indice par rapport au contrôle négatif. Ceci a été confirmé par l'analyse statistique (ANOVA) qui a montré une différence hautement significative ( $p = 0,00$ ) entre les indices mitotiques du témoin négatif et la fraction d'alcaloïdes ainsi que l'extrait aqueux (Annexe 3). La diminution de l'indice mitotique indique un effet mitodepressif, qui pourrait être due à une inhibition de la synthèse de l'ADN et des nucléoprotéines du système biologique (CHAUHAN et *al.*, 1998) ou à une prolongation de la durée des phases G2 et S (WEBSTER et DAVIDSON, 1969). On pourrait suggérer que les extraits qu'on a testés ou bien leurs composants doivent interférer avec le développement normal de la mitose, en prévenant un nombre de cellules d'entrer en prophase et en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade métaphase à cause d'une altération intense de microtubules (FUSCONI et *al.*, 2006).

### 2.1.1.2. Indice d'aberration et anomalies de la division cellulaire

Les différentes étapes de la division cellulaire sont observées en mettant en contact les cellules méristématiques avec de l'eau distillée (T-) et sont représentées dans la figure suivante :

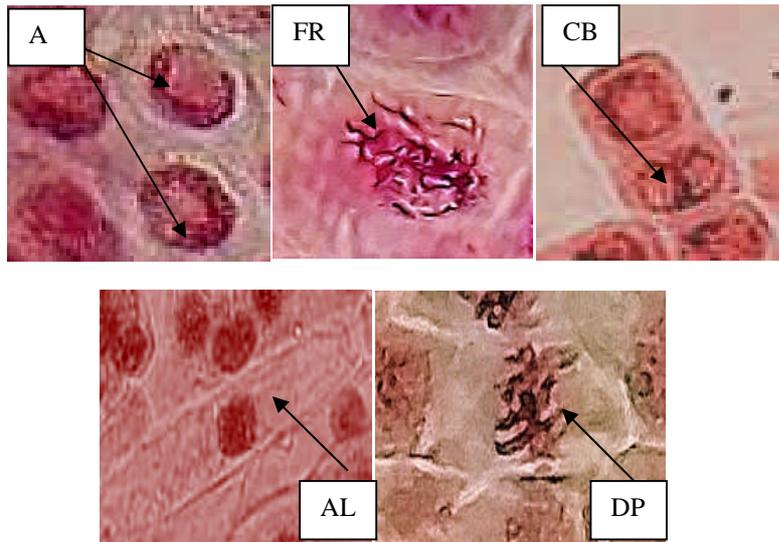


**Figure 16** : Phases mitotiques normales observées chez les cellules méristématiques vue sous microscope optique (X400).

A : prophase ; B : métaphase ; C : anaphase ; D : télophase.

## Partie expérimentale

La colchicine est un alcaloïde connu par son action qui se résume par le blocage de la formation de fuseau mitotique par sa fixation à la tubuline. Les cellules bloquées en mitose subissent un cycle mitotique anormal (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001). Cette approche confirme nos résultats dans lesquels on a observé les différentes anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires notamment des agglutinations chromosomiques (AG), cellules binucléés (CB), allongement des cellules (AL), fragmentation des chromosomes (FR), désorganisation de la plaque équatorial en métaphase (DP) (Figure 17).



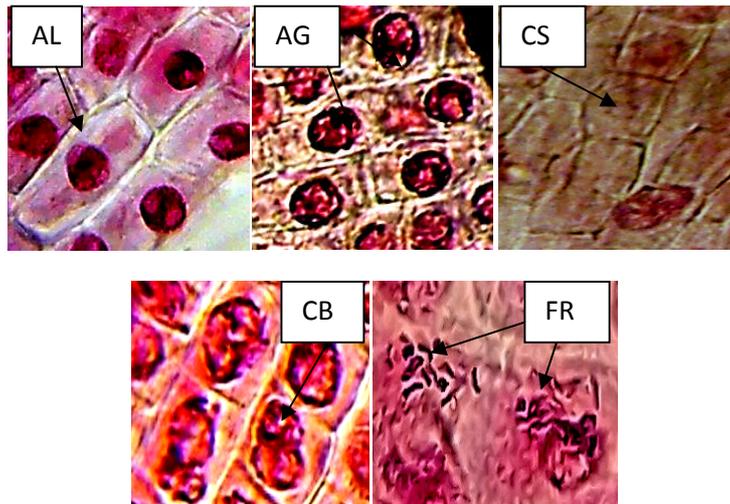
**Figure 17** : Les aberrations chromosomiques, cellulaires et nucléaires rencontrées dans les cellules méristématiques d'oignon suite au traitement avec la colchicine, vue sous microscope optique (X400).

AG : Agglutinations chromosomiques ; FR : Fragmentation des chromosomes ; CB : Cellules binucléés ;

AL : Allongement des cellules ; DP : Désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase.

En ce qui concerne l'effet de la fraction d'alcaloïdes sur les cellules méristématiques, nous avons constaté une inhibition de la division des cellules méristématiques, à différents stades du cycle cellulaire, comparativement aux phases normales. Les anomalies les plus fréquentes sont représentées dans la figure 18.

## Partie expérimentale

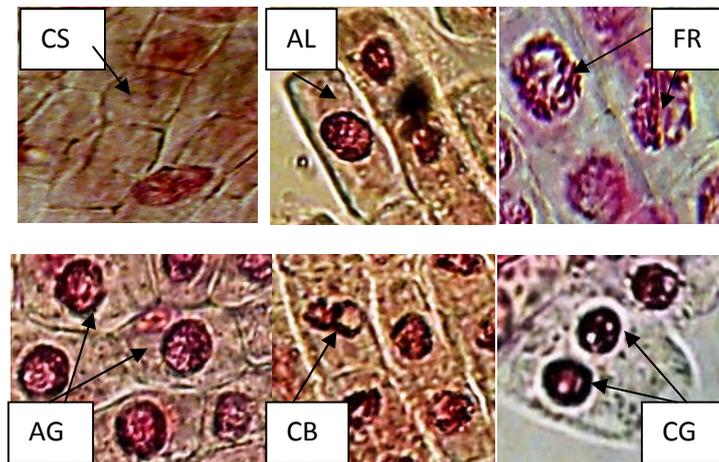


**Figure 18** : Les aberrations observées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L., vue sous microscope optique (X400).

AG : Agglutinations chromosomiques ; CB : Cellules binucléés ;

AL : Allongement des cellules ; FR : Fragmentation des chromosomes ; CS: Cellules sans noyau.

L'observation microscopique des cellules méristématiques exposées à l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a révélé un nombre d'anomalies chromosomiques, cellulaires et nucléaires représentées dans la figure 19.



**Figure 19** : Les aberrations observées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L., vue sous microscope optique (X400).

AG : Agglutinations chromosomiques ; CB : Cellules binucléés ; AL : Allongement des cellules ;

FR : Fragmentation des chromosomes ; CG : Cellules gigantesques ; CS: Cellules sans noyau.

## Partie expérimentale

---

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. Ces dernières peuvent se produire à la fois spontanément et par suite de l'exposition à des agents physiques ou chimiques (OLORUNFEMI et EHWRE, 2011). Dans la présente étude, on remarque que la majorité des anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires se rencontrent dans les cellules méristématiques traitées par la colchicine, ceci peut être expliqué par son action dans le blocage de la formation de fuseau mitotique (VERDIER-PINARD et *al.*, 2001). Les agglutinations chromosomiques représentent l'aberration la plus courante chez les cellules méristématiques traitées par le contrôle positif avec  $5,60 \pm 1,42\%$  comparativement aux échantillons avec un pourcentage plus élevé allant de  $21,49 \pm 1,05\%$  à  $25,14 \pm 2,86\%$  (Tableau V).

Les cellules binucléées et les allongements des cellules quand à elles, sont observées aussi bien en présence de la colchicine et les échantillons. Ces anomalies se sont retrouvées avec un faible pourcentage. L'étude de la cytotoxicité de l'extrait des feuilles d'*Inula viscosa* faite par ASKIN CELIK et ASLANTURK (2010) a montré aussi la présence de cellules binucléées. Ces dernières sont considérées comme le résultat d'une inhibition de la cytokinèse à n'importe quel point de contrôle de cycle cellulaire (ATEEQ et *al.*, 2002).

Nous avons observé des cellules sans noyau, des cellules gigantesques et des fragmentations chromosomiques qui sont dues probablement aux effets clastogènes de nos échantillons (GRANT, 1978). La présence de corps apoptotiques et de désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase a été seulement remarquée chez les cellules méristématiques traitées par la colchicine. Par contre les ponts chromosomiques ont été seulement provoqués par la fraction d'alcaloïdes, ce qui pourrait être due à l'échange chromatidique inégal durant leur translocation en anaphase ou à la présence de chromosomes dicentriques (KONUK et *al.*, 2007). Cette aberration a été également montrée chez les cellules méristématiques traitées par l'extrait méthanolique d'*Euphorbia hirta* (KWAN YUET et *al.*, 2012) (Tableau V).

## Partie expérimentale

**Tableau V:** Indices d'aberrations rencontrées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la colchicine et les différents échantillons.

Indice d'aberrations (%)	AG± ES	CB± ES	AL± ES	PC± ES	FR± ES	DP± ES	CG± ES	CS± ES	CA± ES	AC± ES	Total ± ES
Témoin +	5,60± 1,42	0,74± 0,66	0,86± 0,48	0,00± 0,00	1,89± 0,55	0,23± 0,14	1,94± 1,13	0,86± 0,37	0,17± 0,15	0,00± 0,00	12,29 ± 4,90
Fraction alcaloïdes	21,49 ± 1,05	0,05± 0,04	1,94± 0,24	0,05± 0,04	2,06± 0,50	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,29± 0,25	0,00± 0,00	0,00± 0,00	25,89 ± 2,12
Extrait aqueux 4mg/ml	22,06 ± 2,15	1,09± 0,53	1,09± 0,44	0,00± 0,00	0,17± 0,09	0,00± 0,00	0,11± 0,10	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	24,52 ± 3,31
Extrait aqueux 10mg/ml	25,14 ± 2,86	0,29± 0,32	1,26± 0,28	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,40± 0,21	0,00± 0,00	0,00± 0,00	27,09 ± 3,67

Pour voir l'effet de la concentration sur l'apparition d'aberrations, nous avons varié la concentration de l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml). Cette variation a donné un total d'aberrations proportionnel à la concentration de l'extrait aqueux, dont un maximum de 27,09±3,67 % chez les cellules méristématiques traitée par l'extrait aqueux 10mg/ml.

Le test ANOVA entre la colchicine, la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux ne révèle aucune différence significative concernant les indices d'aberrations (Annexe 3). On peut déduire que tous les extraits de *Verbascum sinuatum* L. présentent une activité antimittotique. Cet effet sur la mitose est probablement due à la présence de métabolites secondaires 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 du genre *Verbascum*, particulièrement les alcaloïdes, les polyphénols et les terpénoïdes ont une action antimittotique et se comportent comme des inhibiteurs d'enzymes impliquées dans le processus du cycle cellulaire (GLINSKA et al., 2007).

### 2.1.1.3. La valeur limite de cytotoxicité (VLC)

La valeur limite de cytotoxicité de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ainsi que la colchicine est représentée dans le tableau suivant :

## Partie expérimentale

**Tableau VI** : Valeurs limites de cytotoxicité de la colchicine et des différents extraits de *Verbascum sinuatum* L.

Echantillon	IM±ES(%)	VLC± ES(%)
Témoin +	35±1,31	37,95±1,26
Fraction d'alcaloïdes	33,00±2,33	35,78±2,52
Extrait aqueux 4mg/ml	42,20±2,44	45,76±2,64
Extrait aqueux 10mg/ml	31,00±2,50	33,61±2,70

La fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux (10mg/ml) ont donné respectivement une valeur limite de cytotoxicité de 35,78±2,52% et 33,61±2,70%. Ces résultats sont proches de ceux obtenus pour le témoin positif (37,95±1,26%). Pour la VLC de l'extrait aqueux à 4mg/ml, on a constaté une différence hautement significative ( $p < 0,05$ ) par rapport à la colchicine et les autres échantillons testés (Annexe 3). Contrairement à l'extrait aqueux à 10mg/ml qui n'a pas montré une différence significative.

PANDA et SAHU (1985) ; SHARMA (1983) considèrent que la valeur limite de cytotoxicité est une diminution de l'indice mitotique de 50% par rapport au témoin négatif provoquant un effet sublétal. Pour cela, on constate que le témoin positif, la fraction d'alcaloïdes ainsi que l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) présentent un effet sublétal.

### 2.2. Dosage des alcaloïdes

Les concentrations d'alcaloïdes contenues dans la fraction et dans l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ont été déduites à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la colchicine ( $Y=0,007 X$ ). Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de colchicine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ) pour l'extrait aqueux et en microgrammes d'équivalent de colchicine par millilitre de fraction pour la fraction d'alcaloïdes (Annexe 2).

La fraction d'alcaloïdes présente la plus forte teneur qui est de 250,95  $\mu\text{g EQ/ml}$  de fraction. En ce qui concerne l'extrait aqueux, il présente une plus faible teneur en alcaloïdes (84,42  $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ). L'étude faite par JOHN et *al* (2014) sur la fraction d'alcaloïdes de certaines

## Partie expérimentale

---

espèces de *Justicia* a montré des résultats similaires. Par contre PATEL et *al* (2015) dans son étude sur *Tinospora cordifolia* a montré des résultats inférieurs (0,652 µg /ml).

### 2.3. Dosage des flavonoïdes

En plus des alcaloïdes, *Verbascum sinuatum* L. possède des composés polyphénoliques bioactifs présentant un grand intérêt pharmaceutique, les flavonoïdes. L'estimation de la teneur de ces composés dans l'extrait aqueux de notre plante est réalisé à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine ( $Y = 0,017X$ ). Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) (Annexe 2). Le dosage de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. montre la présence de flavonoïdes avec un taux faible de 13,58 µg EQ/mg d'extrait. D'après ce résultat, on remarque une nette différence dans le taux de flavonoïdes contenus dans l'extrait aqueux par rapport à celui d'alcaloïdes (84,42µg EQ/mg d'extrait). Cette différence pourrait s'expliquer par la richesse des feuilles de notre plante en alcaloïdes. Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans la présente étude en ce qui concerne les flavonoïdes sont supérieures à ceux trouvées par d'autres auteurs à savoir BOUZID et *al* (2011) et de SAFFIDINE (2015), en utilisant des extraits aqueux d'*Aubepine monogyne* et de *Plantago major* respectivement.

### 2.4. Effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur la membrane érythrocytaire

L'action de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux (4mg/ml et 10mg/ml), sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire, est évaluée par l'effet hémolytique. Ce paramètre est proportionnel au taux d'hémoglobine libérée. Le calcul du pourcentage d'hémolyse est déterminé pour la suspension de globules rouges en contact avec nos échantillons ainsi qu'en présence de saponine (témoin positif) et d'eau physiologique (témoin négatif) (Tableau VII).

## Partie expérimentale

**Tableau VII :** Densités optiques et pourcentages d'hémolyse des témoins et des échantillons.

	<b>DO</b>	<b>% d'hémolyse</b>
<b>Témoin -</b>	0,000±0,000	0,000±0,000
<b>Témoin +</b>	1,800±0,000	100±0,000
<b>Fraction d'alcaloïdes</b>	0,388±0,043	21,550±2,440
<b>Extrait aqueux 4mg/ml</b>	1,264±0,124	73,885±6,885
<b>Extrait aqueux 10mg/ml</b>	1,797±0,000	99,830±0,000

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la cytotoxicité pour leur disponibilité et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine (SITU et BOBEK, 2000). L'interaction d'un composé cytotoxique avec la membrane des globules rouges provoque la perte de leur intégrité ce qui conduit à leur lyse (TIWARI et *al.*, 2011).

D'après notre étude, nous avons noté un pourcentage d'hémolyse de 100% pour notre contrôle positif représenté par la saponine, et de 0,00% pour notre contrôle négatif. Ce résultat confirme les fortes propriétés hémolytiques de la saponine. On remarque que le pourcentage d'hémolyse de la fraction d'alcaloïdes est de 21,55%. Ce pourcentage est relativement faible à celui retrouvé pour la saponine ainsi que pour l'extrait aqueux. Ce dernier a donné une activité hémolytique très élevée pour les deux concentrations (4mg/ml et 10mg/ml). Contrairement à l'extrait aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* qui a présenté une activité hémolytique très faible allant de  $5,05 \pm 1,56$  à  $8,32 \pm 3,66\%$  pour des concentrations de 62,5 à 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (AICHE-IRATNI et *al.*, 2015).

On peut déduire donc que l'activité hémolytique de l'extrait aqueux augmente avec l'élévation de la concentration. L'extrait aqueux à 10mg/ml présente un effet cytotoxique très élevé. Cet effet n'est pas dû seulement à la présence d'alcaloïdes, mais aussi à d'autres composés bioactifs tels que les saponosides (ARRIF, 2009).

## Conclusion et perspectives

---

La présente étude nous a permis de mettre en évidence l'effet antimitotique de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux de *Verbascum sinuatum* L. Cet effet est révélé sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa* par l'observation d'un grand nombre d'anomalies de la division cellulaire. Il est à noter que les agglutinations chromosomiques, les allongements de cellules et les cellules binucléées sont les anomalies les plus fréquentes. Les perturbations au niveau des phases mitotiques sont dues probablement à l'effet des alcaloïdes contenus dans nos extraits qui interfèrent avec la division normale, provoquant un dysfonctionnement du fuseau mitotique conduisant ainsi à des troubles chromosomiques durant le cycle cellulaire.

L'évaluation de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur la membrane érythrocytaire, montre que notre fraction d'alcaloïdes a entraîné un effet hémolytique relativement faible (21,55%) comparativement à celui de l'extrait aqueux (99,83%).

Le dosage spectrophotométrique de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a montré leurs richesses en alcaloïdes avec une teneur de 250,95 µg EQ/ml de fraction pour la fraction d'alcaloïdes et de 84,42 µg EQ/mg d'extrait pour l'extrait aqueux. Cette abondance confère à la plante des propriétés remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques.

En perspectives, il serait intéressant de réaliser des études complémentaires pour comprendre le mécanisme moléculaire et cellulaire des métabolites secondaires par des cultures cellulaires. Ces études viseraient également l'identification de ces molécules bioactives par des techniques de haute performance notamment la spectrométrie de masse (SM) et la chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC).

**Références  
bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

**AKHMANOVA A. et STEINMETZ M.O. (2008).** Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Review, Molecular Cell Biology*, 4(9), 309-322.

**AKINBORO A. et BAKARA A. (2007).** Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 470-477.

**ALIPIEVA I., ORHAN I., TATLI I.I., KOSTADINOV P.E. et MILEN I. (2014).** Treasure from garden : chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochem Review*, (13), 417-444.

**ALLAIN P. (2000).** Les médicaments. 3<sup>ème</sup> Ed., CdM Editions, Angers.

**AMOS L.A. (2004).** Microtubule structure and its stabilization. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(2), 2153-2160.

**ANTONSIE -WICZ D. (1990).** Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of the Ledakrin. *Folia Histochemica and Cytobiologica*, (28), 79-96.

**ASKIN CELIK T. et ASLANTURK O.S. (2010).** Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf extracts with *Allium* Test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-8.

**ATEEK B., ABUL FERAH M., NIAMAT ALI M. et AHMAD W. (2002).** Clastogenicity of pentachlorophenol. 2.4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip. *Mutation Research*, (514), 105-113.

**BABA AISSA F. (2000).** Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie Moderne, Alger.

**BADIAGA M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Université de Bamako, Bamako, Mali.

## Références bibliographiques

---

**BAHATTACHARYYA B., PANDA D., GUPTA S. et BANERJEE M. (2008).** Anti mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal Research Reviews*, 1(28), 155-183.

**BAHORU T., GRINIER B., TROTIN F., BRUNET G., PIN T., LUNCKY M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN C. et PINKAS M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11), 1086–1089.

**BAKKALI A. (1997).** Contribution à la synthèse de la myricidine et de la dihydromyricidine, alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique.

**BOUZID W., YAHIA M., ABDEDDAIM M., ABERKANE M.C. et AYACHI A. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Lebanese Science Journal*, (12), 59-69.

**BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edition médicale internationale, 3ème Ed., éditions Tec & Doc Lavoisier, Paris.

**BRYAN J. (1972).** Characterization of acetyl-3H-labeled vinblastine binding to vinblastine-tubulin crystals. *Journal of Molecular Biology*, 1(66), 157-168.

**CHAUHAN L.K.S., SAXENA P.N. et GUPTA S.K. (1998).** Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany*, (42), 181-189.

**CHEVREMONT M. (1980).** Cytologie et histologie, Ed Maloine, Paris.

**CHEVRET E. (2015).** Notions de Biologie Cellulaire, Biologie Moléculaire et Génétique, Bordeaux.

**CHRETIEN D., et FULLER S.D. (2000).** Effects of XMAP215 on Microtubule Dynamics and Structure. *Journal of Molecular Biology*, 4(298), 663-676.

## Références bibliographiques

---

**CORREIA J.J. et LOBERT S. (2001).** Aspects of Tubulin-Interacting Antimitotic Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 13(7), 1213-1228.

**CRAGG G.M., KINGSTON D.G.I. et NEWMAN D.J. (2005).** Anticancer Effects of Curcumin, Artemisinin, Genistein, and Resveratrol, and Vitamin C: Free Versus Liposomal Forms 1(7).

**CYRIL T. (2001).** Etude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus Roseusen*, vue du développement d'un modèle cinétique. Thèse de doctorat. Université de Montréal, Montréal, Canada.

**DAS T.K., BANERJEE D., CHAKRABORTY D., PAKHIRA M.C., SHRIVASTAVA B. et KUHADR C. (2012).** Saponin: Role in Animal system. 5(4), 248-254.

**DENIS J-N., GREENE AE., GUENARD D., GUERITTE-VOEGELEIN F., MANGATAL L. et POTIER F. (1988).** Recent Trends in Medicinal Plants Research. *Journal of American Chemical Society*, (110), 5917–5919.

**DESAI A. (1997).** Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, (13), 83-117.

**DEWICK P.M. (2001).** Medicinal natural products : biosynthetic approach. 2<sup>ème</sup>Ed., John Wiley and Sons, Angleterre.

**DEY P.M. et HARBONE J.B. (1991).** Methods in plant biochemistry. 1<sup>ère</sup> Ed., Academic Press, Londre.

**DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJMI B., BOUTASSOUNA D., STOCKER P. et VIDAL N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (4), 654-660.

## Références bibliographiques

---

**DUCHNOWICZ P., BORSA M., PODS-EDEKB A., KOTER-MICHALAKA M. et BRONCELC M. (2012).** Effect of polyphenols extracts from *Brassica* vegetables on erythrocyte membranes (*in vitro* study). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (34), 783–790.

**DUSTIN P. (1980).** Microtubules. *Scientific American*, 2(243), 66-76.

**EDZIRI H., AMMAR S., MOHAMED ALI S. et MAHJOUB M.A. (2011).** Antioxidant, Antibacterial and antiviral effects of *Lactuca sativa* extracts. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1182-2285.

**FERNANDE T.C.C., MAZZEO D.E.C. et MARIN-MORALES M.A. (2007).** Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry Physiology*, (88), 252–259.

**FUSCONI A., REPETTO O., BONA E., MASS N., GALLO C., DUMAS-GAUDOT E. et BERTA G. (2006).** Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, (58), 253–260.

**GASTON B. et GRIOT A. (1986).** Plantes médicinales, plantes mellifères, plantes utiles et nuisibles ; In : «*Bulletin mensuel de la Société linnéenne* » Réédition, Lyon.

**GHORBAL M. (2011).** Biologie cellulaire histologie et embryologie. Ellipses, Paris.

**GIGANT B., WANG C., RAVELLI R.B., ROUSSI F., STEINMETZ M.O., CURMI P.A., SOBEL A. et KNOSSOW M. (2005).** Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, 7041(435), 519-522.

**GIRASOLE M.S., DINARELLI G. et BOUMI S. (2012).** Structure and fonction in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale. *Micron*, 43(12), 1273-1286.

## Références bibliographiques

---

**GLINSKA S., BARTEZAK M., OLEKSIK S., WOLSKA A., GABARA B., POSMYK M. et JANAS K. (2007).** Effects of anthocyanin-rich extract from redcabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa*. Root treated with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (68), 343-350.

**GRANT W.F. (1978).** Chromosome aberrations in plant as monitoring system. *Environnement Health Perspective*, (27), 37-43.

**GROSIO K., HOLWELL S.E., MCGOWN A.T., PETTIT G.R. et BIBBY M.C. (1999).** *British Journal of Cancer*, 8(81), 1318-1327.

**HADDOUCHI F., LAZOUNI H.A., MEZIANE A. et BENMANSOUR A. (2009).** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss and Reut. *Afrique Science*, 05(2), 246- 259.

**HAIT W.N., RUBIN E., ALLI E. et GOODINA S. (2006).** Tubulin Targeting Agents. *Update on Cancer Therapeutics*, 37(18).

**HARBONE J.B. (1998).** Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis, 3<sup>ème</sup> Ed., London.

**HARBONE J.B. et HERBERT B. (1995).** Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants. Bristol, Taylor & Francis, London.

**HOWARD J. et HYMAN A.A. (2003).** Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 6933(422), 753-758.

**IKEDA K., PANT B., MISHIRO A., OZAWA K., MASUJINAT. et SUGIYANA M. (2000).** A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Jornal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (5), 574-576.

**JAUREGUIBERRY S. (2015).** Rétention et " pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

## Références bibliographiques

---

**JOHN B., SULAIMAN C.T., SATHEESH G. et REDDY V.R.K. (2014).** Spectrophotometric estimation of total alkaloids in selected *Justicia* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 647-648.

**JONHSON I.S., ARMSTRONG J.G., GORMAN M. et BURNETT J.P. (1963).** The vinca alkaloids : A New class of Oncolytic Agents. *Cancer Research.*, 8(23), 1390-1397.

**JORDAN M.A. et WILSON L. (1998).** Microtubules and actin filaments : dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology*. 1(10), 123-130.

**JORDE L., CARY J., BOMSHAD M. et WITE R. (2004).** Génétique médicale, Elsevier, Paris.

**KOSCH A. (1939).** Handbuch der Deutschen Arzneipflanzen. Springer, Berlin.

**KUREK-GORECKA A., GEORECKI M., RZEPECKA-STOJKO A., SOSADA M., SWIERCZEK-ZIEBA G. et JERZY S. (2013).** Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from *Propolis*. *Molecules*, 19(1), 78-101.

**KWAN YUET P., IBRAHIM D., UMI KALSOM Y., CHEN Y. et SREENIVASAN S. (2012).** Genotoxicity of *Euphorbia hirta* : an *Allium cepa* assay. *Molecules*, (17), 7782-7791.

**LENORMAND G. (2001).** Elasticité du squelette du globule rouge humain-une étude par pinces optiques. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

**LEROUX S. (2011).** Synthèse d'alkaloïdes de Vinca et nouvelle approche de la synthèse de la (D)- méquitazine. Thèse de Doctorat. Université Paris Sud, Paris, France.

**LIMAN R., KONUK M. et CIGERCI H. (2007).** Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pak J Botanic*, 39(1), 73-79.

**MAILLET M. (2002).** Biologie cellulaire. Masson, Paris.

## Références bibliographiques

---

**MAILLET M. (2006).** Biologie cellulaire. 10<sup>ème</sup> Ed., Masson, Paris.

**MAILLET M. (2008).** Abrégé de cytologie. Masson, Paris.

**MAILLET M. et LEMILLOIS. M. (2006).** Biologie cellulaire. Masson, Paris.

**MANFREDI J.J. et HORWITZ S.B. (1984).** Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Experimental Cell Research*, 1(150), 205-217.

**MANITTO P. (1981).** Biosynthesis of natural products. John Wiley & Sons, New York.

**MANN J., DAVIDSON R.S., HOBBS J.B., BANTHORPE D.V. et HARBONE J.B. (1994).** Natural products : their chemistry and biological significance. 1<sup>ère</sup> Ed., Longman scientific and technical, New York.

**MAURO N.M. (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

**MEDJEBER M., SMAIL-SAADOUN N. et SAIDI F. (2018).** Activité antimetabolique de deux espèces d'*Aspergillus* : Mycoendophytes foliaires de *Limoniastrum féei* (Girard) Batt. D'Oued Aghlal (Bechar, Algérie). *Revue Agrobiologia*, 8(1), 871-878.

**MEZZOU H., KHELIFA A.B., NEFFATI F., DOUKI W., BEN AMOR A. et NAJJAR M.F. (2006).** Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de l'hémolyse en biochimie clinique. *Revue Francophone des Laboratoires*, (386), 59-64.

**MOSSERAY R. (1935).** Matériaux pour une flore de Belgique : IV-le genre *Verbascum*. *Royal Botanical Society of Belgium*, (68), 88-103.

**NA G.C. et TIMASHEFF S.N. (1986).** Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology. *Biochemistry*, 20(25), 6214-6222.

## Références bibliographiques

---

**NEWMAN M.A. et ERBS G. (2012).** The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology*, (13), 95-104.

**NKHILI A. et ZOHRA E. (2004).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Université D'Avignon, Montpellier, France.

**NOSTRO A., CANNATELLI M.A., MORELLI I., CIONI P.L., MARINO A. et ALONZO V. (2002).** Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with and without EDTA. *Letters in Applied Microbiology*, (35), 385-389.

**OLORUNFEM D. I. et EHWRE O. E. (2010).** Chromosomal aberrations induced in root tips of *Allium cepa* by squeezed garri extracts. *Report and Opinion*, 2(12), 166-171.

**OUZID Y., SMAIL-SAADOUN N. et HOUALI K. (2019).** Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of *Peganum harmala* L. from Dayate Aiat (Laghouat, Algeria). *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 11(2), 587-604.

**PATEL R.K., PATEL J.B. et TRIVEDI P.D. (2015).** Spectrophotometric method for estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its herbal formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(7), 249-251.

**PATEL- CHIRAG J., MANGUKIA DHURU K., RAJESH A., SANJEETA., SANDEEP K. et PINKESH P. (2012).** Formulation and evaluation of matrix diffusion controlled transdermal drug delivery system of glipizide. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(1), 41-48.

**PAUME M.C. (2007).** Sauvage et médicinales. Edisud, Paris.

**POLETTI A. (1988).** Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed., Delachaux & Niestlé, Suisse.

## Références bibliographiques

---

**QUEZELL F. et SANTA S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris.

**RACUCIU M., et CREANGA D. (2007).** Cytogenetic changes induced by aqueous ferrofluids in agricultural plants. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, (311), 288-290.

**RAKOTONANAHARY M. (2012).** *Peumus boldus* M. : de la botanique à la thérapeutique. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

**SAFFIDINE K., SAHLI F. et ZERROUG M.M. (2015).** Antioxidant and Antibacterial activities of *Plantago major*. *International Journal Pharmaceutica Science*, (7), 58-64.

**SCHIFF P.B. et HORWITZ S.B. (1981).** Molecular Oncology : Underlying Mechanisms and Translational Advancements. *Biochemistry*, 11(20), 3247-3252.

**SHAHAT EMAM S. et ABD EL-MOATY H.I. (2009).** Primary metabolites and flavonoid constituents of *Isatis microcarpa* Gay ex Boiss. *Journal of Natural Products*, (3), 12-26.

**SHI Q., CHEN K., MORRIS –NATSCHKE S.L. et LEE KH. (1998).** Recent progress in the development of tubulin inhibitors as antimitotic antitumor agents. *Current Pharmaceutical Design*, 3(4), 219-248.

**SHWETA S., KHADABADI S. et GANESH T.G. (2012).** *In vitro* antimitotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extract of *Revia hypocrateriformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 503-506.

**SOOTODEH A. (2015).** Histoire biogéographique et évolutive des genres *Verbascum* et *Artemisia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France.

**SWYNGHEDAU W. (2008).** Biologie et génétique moléculaires. 3<sup>ème</sup> Ed., Dunod, Paris.

## Références bibliographiques

---

**TABASUM S.H., KHARE S., JAIN K. (2016).** Spectrophotometric quantification of total phenolic, flavonoid, and alkaloid contents of *Abrus precatorius* L.seeds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2(9), 371-374.

**TABET M., ABDA A., BENOURETH D.E., LIMAN R., KONUK M., KHALLEF M. et TAHER A. (2015).** Mutagenic and genotoxic effects of Guelma's urban wastewater. *Algeria Environmental Monitoring and Assessment*, 187 (26), 114-121.

**TATLI I.I. et AKDEMIR ZS. (2004).** Chemical constituents of *Verbascum* Species. *Fabad Journal Pharma Science*, (29), 93-107.

**TATLI I.I., SCHUHLY W. et AKDEMIR Z.S. (2007).** Secondary metabolites from bioactive methanolic extract of *Verbascum pycnostachyum* Boiss. & Helder flowers. *Journal of the Faculty of Pharmacy*, 1(27), 23-32.

**TISON J.M. et FOUCAULT B. (2014).** Flora gallica, flore de France. Société botanique de France, biotope édition, Paris.

**TIWARI P., KUMAR B., KAUR M., KAUR G. et KAUR H. (2011).** Phytochemical screening and extraction. *Internationale Pharmaceutica Science*, 1(1), 98-106.

**VAN-DER-VAART B., AKHMANOVA.A. et STRAUBE A. (2009).** Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochemical Society Transactions*, 5(37), 1007-1013.

**VERDIER-PINARD P., LANSIAUX A. et BAILLY C. (2001).** Combretastatin A4 phosphate. *Bulletin du Cancer*, 88 (3), 235-239.

**VERONES V. (2001).** Conception, synthèse et évaluations pharmacologiques de nouveaux perturbateurs du fuseau mitotique. Thèse de Doctorat. Université du droit et de la santé, Lille, France.

**VINCENT R. (2007).** Génétique moléculaire. De Boeck université, Paris.

**WEBSTER P.L. et DAVIDSON D. (1969).** Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indol-3-ylacetic acid in *Vicia faba* roots. *Journal of Experimental Botany*, (20), 671-685.

## Références bibliographiques

---

**YARNELL E. (2007).** Plant chemistry in veterinary medicine: Medicinal constituents and their mechanisms of action. In: «Veterinary herbal medicine» ed. Mosby Elsevier, St Louis.

## Annexes

---

**Annexe 1** : La gamme d'étalonnage de colchicine et de quercétine.

1. Gamme d'étalonnage de la colchicine.

Tube	Blanc	1	2	3	4	5
Concentration: µg/ml	0	20	40	60	80	100
Solution mère (µg/ml)	0	400	800	1200	1600	2000
Eau distillée (µl)	2000	1600	1200	800	400	0
DO	0	0,129	0,291	0,461	0,611	0,677

2. Gamme d'étalonnage de la quercétine.

Tube	Blanc	1	2	3	4	5	6
Concentration: µg/ml	0	10	20	30	40	50	60
Solution mère (µg/ml)	0	100	200	300	400	500	600
Méthanol (µl)	1000	900	800	700	600	500	400
DO	0	0,136	0,302	0,455	0,683	0,973	1,043

## Annexes

---

**Annexe 2 :** Détermination de la teneur d'alcaloïdes dans la fraction et l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ainsi que la teneur de flavonoïdes dans l'extrait aqueux.

1. Détermination de la concentration d'alcaloïdes dans la fraction.

DO 1	DO 2	DO 3	Moyenne± écart type
0,187	0,208	0,132	0,175±0,027

A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la colchicine qui est la suivante :

$$Y = 0,007 X.$$

La concentration d'alcaloïdes X :

$$0,175=0,007X ; X= 250,95 \mu\text{g EC/mg de fraction.}$$

2. Détermination de la concentration d'alcaloïdes dans l'extrait aqueux.

DO 1	DO 2	DO 3	Moyenne± écart type
0,590	0,566	0,617	0,591±0,020

A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la colchicine qui est la suivante :

$$Y = 0,007 X.$$

La concentration d'alcaloïdes X :

$$0,591=0,007X ; X= 84,42 \mu\text{g EC/mg d'extrait.}$$

## Annexes

---

### 3. Détermination de la concentration de flavonoïdes dans l'extrait aqueux.

DO 1	DO 2	DO 3	Moyenne± écart type
0,223	0,255	0,216	0,231±0,016

A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine qui est la suivante :

$$Y = 0,017 X.$$

La concentration de flavonoïdes X :

$$0,231=0,017X ; X= 13,58 \mu\text{g EC/mg d'extrait}.$$

## Annexes

**Annexe 3** : Résultats obtenues de l'analyse d'indice mitotique, d'indice de phases, d'indices d'aberrations et des valeurs limites de cytotoxicité par le test ANOVA à un facteur.

### 1. Indice mitotique

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>40449,60</b>	<b>1</b>	<b>40449,60</b>	<b>4106,558</b>	<b>0,000000</b>
Témoins	8179,60	1	8179,60	830,416	0,000000
Erreur	78,80	8	9,85		

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>40449,60</b>	<b>1</b>	<b>40449,60</b>	<b>4106,558</b>	<b>0,000000</b>
T-, FA	8179,60	1	8179,60	830,416	0,000000
Erreur	78,80	8	9,85		

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>45158,40</b>	<b>1</b>	<b>45158,40</b>	<b>1866,050</b>	<b>0,000000</b>
T-, Eq 4	6250,00	1	6250,00	258,264	0,000000
Erreur	193,60	8	24,20		

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>37945,60</b>	<b>1</b>	<b>37945,60</b>	<b>1511,777</b>	<b>0,000000</b>
T-, Eq10	9363,60	1	9363,60	373,052	0,000000
Erreur	200,80	8	25,10		

## Annexes

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>11560,00</b>	<b>1</b>	<b>11560,00</b>	<b>544,0000</b>	<b>0,000000</b>	
T+,FA	10,00	1	10,00	0,4706	0,512103	
Erreur	170,00	8	21,25			

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>14899,60</b>	<b>1</b>	<b>14899,60</b>	<b>652,0613</b>	<b>0,000000</b>	
t+,Eq 4	129,60	1	129,60	5,6718	0,044438	
Erreur	182,80	8	22,85			

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>10890,00</b>	<b>1</b>	<b>10890,00</b>	<b>458,5263</b>	<b>0,000000</b>	
T+,Eq10	40,00	1	40,00	1,6842	0,230532	
Erreur	190,00	8	23,75			

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>14137,60</b>	<b>1</b>	<b>14137,60</b>	<b>397,1236</b>	<b>0,000000</b>	
FA, Eq4	211,60	1	211,60	5,9438	0,040692	
Erreur	284,80	8	35,60			

Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>10240,00</b>	<b>1</b>	<b>10240,00</b>	<b>280,5479</b>	<b>0,000000</b>	
FA,Eq10	10,00	1	10,00	0,2740	0,614864	
Erreur	292,00	8	36,50			

## Annexes

### 2. Indice de phases

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>4499,06</b>	<b>1</b>	<b>4499,056</b>	<b>8,468334</b>	<b>0,006332</b>
T-, T+	851,96	1	851,959	1,603597	0,214002
Erreur	18063,52	34	531,280		

Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>9865,25</b>	<b>1</b>	<b>9865,253</b>	<b>13,14717</b>	<b>0,000842</b>
T-FA	2202,55	1	2202,553	2,93529	0,094812
Erreur	28514,08	38	750,371		

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>11401,77</b>	<b>1</b>	<b>11401,77</b>	<b>14,06474</b>	<b>0,000588</b>
T-, Eq4	1558,38	1	1558,38	1,92235	0,173679
Erreur	30805,19	38	810,66		

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>9562,63</b>	<b>1</b>	<b>9562,629</b>	<b>12,96417</b>	<b>0,000905</b>
T-, Eq10	2349,02	1	2349,016	3,18459	0,082321
Erreur	28029,55	38	737,620		

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>2946,887</b>	<b>1</b>	<b>2946,887</b>	<b>14,50886</b>	<b>0,000495</b>
T+,FA	3,582	1	3,582	0,01764	0,895052
Erreur	7718,159	38	203,109		

## Annexes

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>2782,558</b>	<b>1</b>	<b>2782,558</b>	<b>14,61745</b>	<b>0,000475</b>	
T+, Eq 10	11,751	1	11,751	0,06173	0,805122	
Erreur	7233,628	38	190,359			

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>3811,87</b>	<b>1</b>	<b>3811,866</b>	<b>14,47167</b>	<b>0,000503</b>	
T+, Eq4	30,94	1	30,941	0,11747	0,733688	
Erreur	10009,27	38	263,402			

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>2782,558</b>	<b>1</b>	<b>2782,558</b>	<b>14,61745</b>	<b>0,000475</b>	
FA, Eq4	11,751	1	11,751	0,06173	0,805122	
Erreur	7233,628	38	190,359			

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>2586,468</b>	<b>1</b>	<b>2586,468</b>	<b>13,23015</b>	<b>0,000815</b>	
FA, Eq10	2,357	1	2,357	0,01206	0,913143	
Erreur	7428,922	38	195,498			

Tests Univariés de Significativité pour IP (ANOVA calcule des IM) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>3400,336</b>	<b>1</b>	<b>3400,336</b>	<b>13,29345</b>	<b>0,000795</b>	
Eq4, Eq10	80,826	1	80,826	0,31599	0,577330	
Erreur	9720,033	38	255,790			

## Annexes

### 3. Indice d'aberrations

Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	3445,69	1	3445,690	14,87497	0,000206	
T+, FA	240,25	1	240,250	1,03715	0,310992	
Erreur	22701,06	98	231,643			

Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	3260,41	1	3260,410	12,07223	0,000764	
T+, Eq4	193,21	1	193,210	0,71539	0,399720	
Erreur	26467,38	98	270,075			

Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	4844,16	1	4844,160	11,93356	0,000816	
T+, Eq10	696,96	1	696,960	1,71696	0,193148	
Erreur	39780,88	98	405,927			

Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	5270,76	1	5270,760	11,93398	0,000816	
FA, Eq4	2,56	1	2,560	0,00580	0,939468	
Erreur	43282,68	98	441,660			

Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	7242,01	1	7242,010	12,54002	0,000611	
FA, Eq10	118,81	1	118,810	0,20573	0,651140	
Erreur	56596,18	98	577,512			

## Annexes

Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>6972,25</b>	<b>1</b>	<b>6972,250</b>	<b>11,31962</b>	<b>0,001096</b>
Eq4, Eq10	156,25	1	156,250	0,25368	0,615629
Erreur	60362,50	98	615,944		

#### 4. Valeurs limites de cytotoxicité.

Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>13585,12</b>	<b>1</b>	<b>13585,12</b>	<b>541,9267</b>	<b>0,000000</b>
T+,FA	11,49	1	11,49	0,4584	0,517458
Erreur	200,55	8	25,07		

Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>17510,88</b>	<b>1</b>	<b>17510,88</b>	<b>650,8244</b>	<b>0,000000</b>
T+,Eq4	153,35	1	153,35	5,6996	0,044036
Erreur	215,25	8	26,91		

Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>12797,79</b>	<b>1</b>	<b>12797,79</b>	<b>457,3231</b>	<b>0,000000</b>
T+,Eq10	46,48	1	46,48	1,6611	0,233478
Erreur	223,87	8	27,98		

Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	<b>16625,19</b>	<b>1</b>	<b>16625,19</b>	<b>397,0804</b>	<b>0,000000</b>
FA, Eq4	248,80	1	248,80	5,9424	0,040710
Erreur	334,95	8	41,87		

## Annexes

---

Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>12042,29</b>	<b>1</b>	<b>12042,29</b>	<b>280,3987</b>	<b>0,000000</b>	
FA , Eq10	11,75	1	11,75	0,2736	0,615097	
Erreur	343,58	8	42,95			

Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>15752,96</b>	<b>1</b>	<b>15752,96</b>	<b>351,7501</b>	<b>0,000000</b>	
Eq4, Eq10	<b>368,69</b>	<b>1</b>	<b>368,69</b>	<b>8,2326</b>	<b>0,020853</b>	
Erreur	358,28	8	44,78			

# Annexes

---