

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie - Microbiologie

Mémoire

De fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme

Du MASTER en Biologie

Option : Biochimie de la nutrition

***Effet antimitotique et antiprolifératif des extraits aqueux
des feuilles de deux plantes médicinales : *Phlomis bovei* de
Néo et *Verbascum sinuatum****

Présenté par :

M^{ELLE} LAZRI Kahina

Soutenu le 17 Septembre 2018

Devant le Jury :

Président : M^r HOUALI Karim

Professeur à U.M.M.T.O

Promotrice : M^{me} IRATNI Ghenima

Maitre de conférence classe B à U.M.M.T.O

Co-promotrice : M^{elle} OUZID Yasmina

Docteur à U.M.M.T.O

Examineur : M^r MOUALEK Idir

Maitre de conférence classe B à U.M.M.T.O

2017- 2018

REMERCIEMENTS

Je remercie ALLAH tout puissant de m'avoir accordée la force, le courage et la volonté afin de pouvoir accomplir ce modeste travail qui représente le fruit de plusieurs années d'études.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et ma haute considération à M^r le professeur HOUALI Karim de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de recherche LABAB, et pour avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également à ma promotrice M^{me} IRATNI Ghenima qui ma permis de mener à bien ce modeste travail, et de m'avoir si bien dirigée et conseillée.

Mes remerciements s'adressent également à ma co-promotrice M^{lle} OUZID Yasmina pour sa précieuse aide, sa disponibilité, ces encouragements et pour sa patience durant toute la période de la réalisation de ce manuscrit.

Mes remerciements chaleureux vont également à mes amis (es), je les remercie pour leur aide, leur amitié et leurs encouragements. Je les remercie vivement pour tous les moments agréables partagés ensemble.

Enfin, ma reconnaissance s'adresse aussi à tous ceux qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Kahina

DEDICACE

À la mémoire de mon grand père.

À mon très cher père et à ma douce mère, rien au monde ne vaut vos efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être, vos sacrifices pour moi, votre compréhension, vos conseils et vos encouragements sont pour moi les soutiens indispensables qui ont guidés mes pas vers la réussite.

À mes chères sœurs et cousines que j'aime beaucoup.

À toute la famille LAZRI et AZOUAOU, et à tous mes proches.

À mes meilleurs (e) amis (es) : Mazigh, Mouloud, Hâkim, et Karima.

Kahina

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie Bibliographie

I. Étude bibliographique sur *Phlomis bovei* de Néo et *Verbascum sinuatum*

1.1. *Phlomis bovei* de Néo 2

1.1. 1. Généralités sur le genre *Phlomis* 2

1.2. 1.1.2. Usages traditionnels du genre *Phlomis* 2

1.1.3. Etude phytochimique du genre *Phlomis*..... 2

1.1.4. Activités biologiques du genre *Phlomis*..... 3

1.1.5. *Phlomis bovei* de Noé..... 3

1.1.5.1. Description botanique 3

1.1. 5.2. Etude phytochimique de *Phlomis bovei* 4

1.1.5.3. Activités biologiques de *Phlomis bovei* 4

1.2. *Verbascum sinuatum*... 5

1.2.1. Généralités sur le genre *Verbascum* 5

1.2.2. Usages traditionnels de *Verbascum* 6

1.2.3. Etude phytochimique du genre *Verbascum*..... 6

1.2.4. Espèce *Verbascum sinuatum* 7

1.2.4.1. Description botanique 7

1.2.4.2. Etude phytochimique de l'espèce *Verbascum sinuatum* 8

1.2.4.3. Activités biologiques de <i>Verbascum sinuatum</i>	8
---	---

II. Rappel sur la mitose, les agents antimitotiques et l'effet cytotoxique

2.1. Mitose	9
2.2. Phases de la mitose.....	10
2.3. Principaux composants de la mitose	11
2.4. Agents antimitotiques d'origine végétale.....	13
2.4.1. Classification et mécanisme d'action des agents antimitotiques	14
2.4.1.1. Les taxoïdes.....	14
2.4.1.2. Les vinca-alcaloïdes	15
2.4.1.1. Les alcaloïdes	16
2.5. Effet cytotoxique des molécules d'origine végétale.....	17
2.5.1. Molécules à effet cytotoxique	18

Partie Expérimentale

I. Matériels et méthodes

1.1. Matériel	20
1.1.1. Matériel végétal.....	20
1.1.2. Préparation des racines d' <i>Allium cepa</i>	20
1.1.3. Préparation du milieu de culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.1.4. Description de la cellule de Malassez	21
1.1.5. Préparation de la suspension de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.1.6. Description de la plaque stérile	22
1.1.7. Réactifs et solutions	23

1.1.8. Petits matériels	24
1.1.9. Appareillages.....	24
1.1.10. Analyse statistiques	24
1.2. Méthodes	25
1.2.1. Activité antimittotique	25
1.2.1.1. Préparation des extraits aqueux de plantes médicinales.....	25
1.2.1.2. Mise en œuvre de l'activité antimittotique.....	25
1.2.2. Activité antiproliférative -MTT	27
1.2.2.1. Principe de MTT	27
1.2.2.2. Préparation de la plaque stérile	28
II. Résultats et discussions	
2.1. Activité antimittotique.....	30
2.2. Activité antiproliférative – MTT.....	38
Conclusion et perspectives	41
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

ADN : Acide Ribonucléique

ANOVA : Analyse de La Variance

CDK2 : Cyclin-Dépendante Kinase 2 (kinase dépendante de cycline 2)

CDK4 : Cyclin-Dépendante Kinase 4 (kinase dépendante de cycline 2)

FDA : Flavine Adénine Dinucléotide

G1 : Gap1 (intervalle 1)

G2 : Gap2 (intervalle 2)

IM : Indice Mitotique

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tetrazolium

NA₂HPO₄ : Hygrogénophosphate de Sodium (Phosphate Disodique)

p : p-value (la valeur de probabilité)

SDS : DodécylSulfate de Sodium

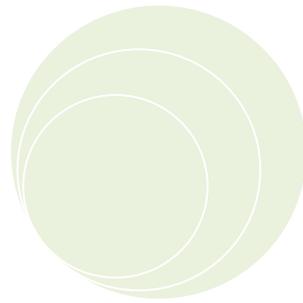
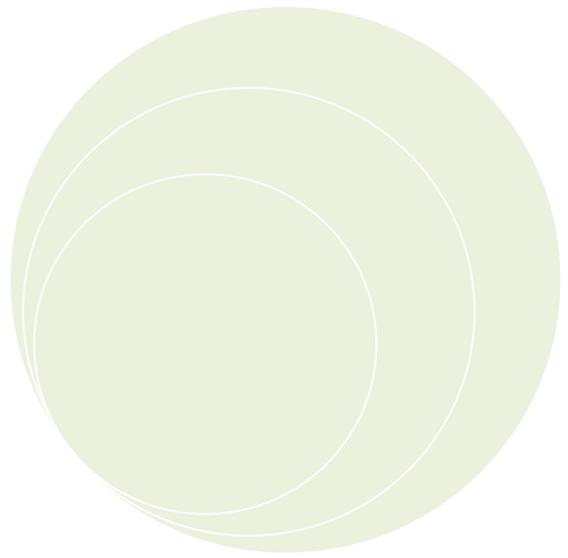
Liste des figures

Figure 1 : Espèce <i>Phlomis bovei</i>	4
Figure 2 : Structures de tanin.	4
Figure 3 : Quelques structures biochimiques des métabolites secondaires du genre <i>Verbascum</i>	7
Figure 4 : <i>Verbascum sinuatum</i>	7
Figure 5 : Structure chimique de l'harpagide et de l'aucubine	8
Figure 6 : Différentes phases du cycle cellulaire	10
Figure 7 : Différentes étapes de la mitose	11
Figure 8 : Structure et dynamique du microtubule.....	12
Figure 9 : Structure d'un kinétochore	13
Figure 10 : Structure du Taxol	14
Figure 11 : Structures de quelques vinca-alcaloïdes	15
Figure 12 : Structure chimique de la colchicine.....	16
Figure 13 : Structures de quelques alcaloïdes	17
Figure 14 : Structure générale des flavonoïdes	18
Figure 15 : Structure chimique de la quercétine	19
Figure 16 : Bulbes d' <i>Allium cepa</i> misent à croître dans de l'eau.....	20
Figure 17 : Microscope optique.....	24
Figure 18 : Spectrophotomètre.....	24
Figure 19 : Différentes étapes de la mise en œuvre de l'activité antiméiotique	26
Figure 20 : Réaction chimique de la conversion du MTT en formazan.....	27

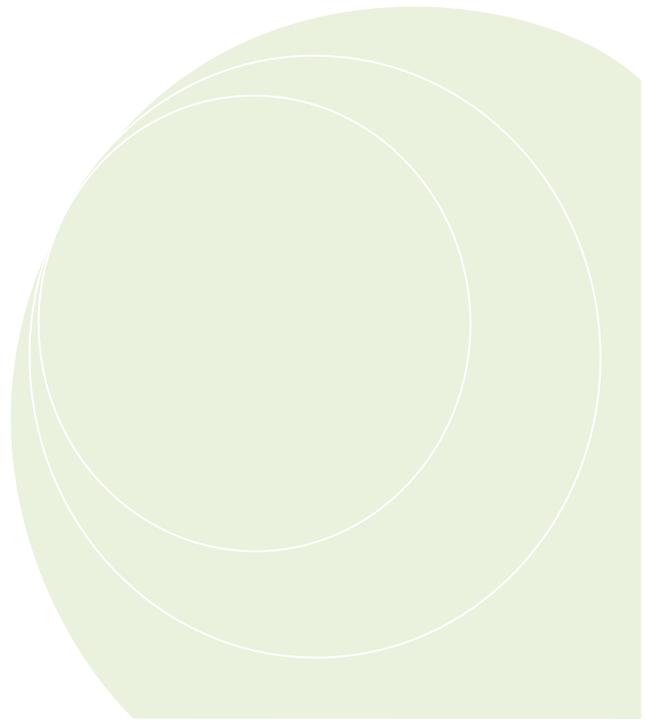
Figure 21 : Préparation de la plaque stérile	28
Figure 22 : Préparation de la plaque stérile de l'activité antiproliférative- MTT	29
Figure 23 : Indices mitotiques des différents extraits testés	30
Figure24 : Différentes étapes de la division cellulaire observées dans les racines méristématiques d' <i>Allium cepa</i>	32
Figure25 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par la colchicine	33
Figure 26 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par l'extrait aqueux des feuilles de <i>Phlomis bovei</i> .	34
Figure 27 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées dans des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées avec l'extrait aqueux de feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i>	35

Liste des tableaux

Tableau I : Réactifs et les solutions utilisés pour l'activité antimitotique et l'activité antiproliférative.....	23
Tableau II : Différents indices mitotiques des extraits testés	31
Tableau III : Taux de mortalité du témoin et des extraits végétaux aqueux	38



INTRODUCTION GENERALE



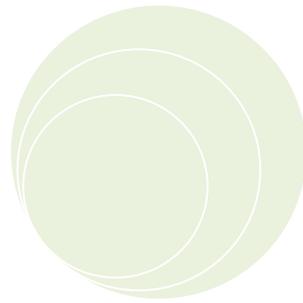
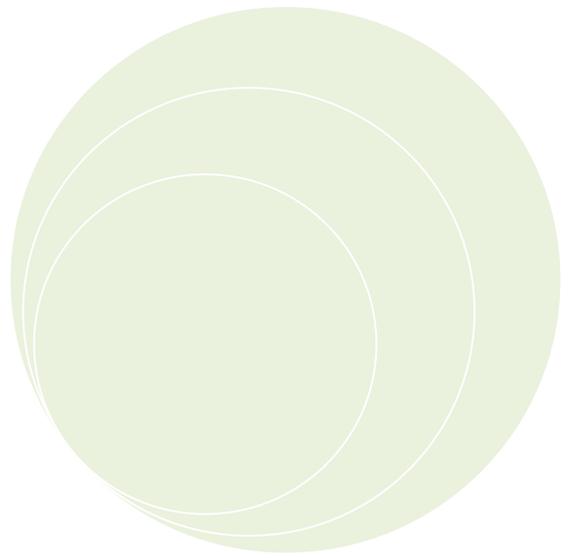
De l'antiquité à nos jours, l'Homme s'est toujours donné les moyens de combattre la douleur ; ces moyens efficaces ou non lui sont souvent fournis par son environnement naturel et sont essentiellement à base de plantes. Les extraits des plantes étaient, déjà, connus et utilisés par les égyptiens, les romains et les grecs, pour leurs propriétés odorantes et médicinales (DIALLO *et* DIOUF, 2000). Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments (MOHAMMEDI, 2013).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leurs capacités à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires (phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes) dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans de différents domaines : culinaires, agricole et médicinale ; pour ce dernier il est principalement utilisé comme antibiotique, antioxydant, antimicrobien, antimitotique et antiprolifératif (AMAS, 1997 ; KRIEF, 2003 et JEAUN *et al.*, 2005).

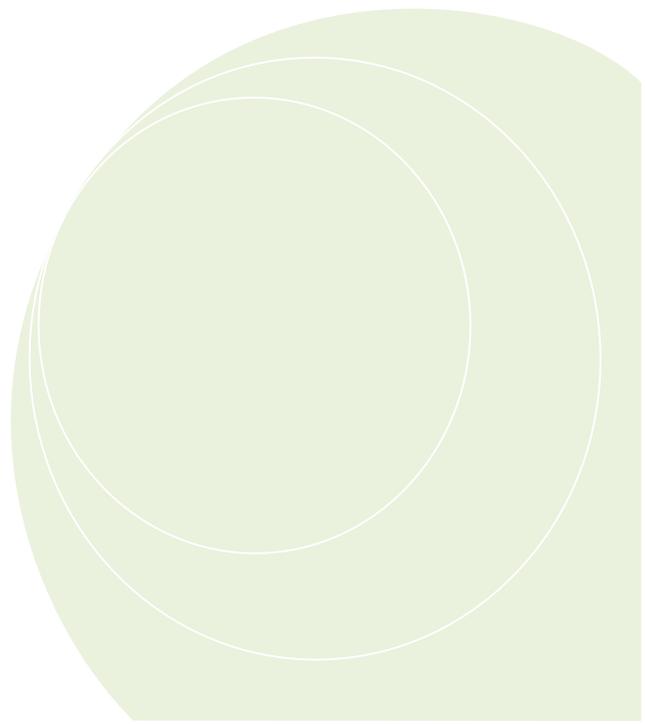
Les antimitotiques sont des médicaments utilisés pour leurs propriétés anticancéreuses. Sont utilisés dans le cadre d'une chimiothérapie, ils sont capables de détruire les cellules cancéreuses et de freiner leur multiplication. Par contre les molécules à effet cytotoxique sont utilisées dans le but d'inhiber la prolifération cellulaire.

Phlomis bovei, et *Verbascum sinuatum* qui sont originaires méditerranéennes, ils représentent une source prometteuse dans la production des substances naturelles d'intérêt thérapeutique antimitotique et antiproliférative.

L'objectif de la présente étude est l'évaluation de l'effet antimitotique et antiprolifératif des deux plantes (extraits aqueux de poudre de feuilles séchées), fourni par le laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique, (LABAB) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.



**PARTIE
BIBLIOGRAPHIE**



I. Etude bibliographique sur *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*

1.1. *Phlomis bovei* de Néo

1.1. 1. Généralités sur le genre *Phlomis*

Phlomis est un genre qui appartient à la famille des Lamiaceae. Il renferme plus de 100 espèces qui sont répandues principalement dans l'Asie centrale, la Chine et dans les régions méditerranéennes (BADER *et al.*, 2015). Trois espèces de *Phlomis* poussent en Algérie (*P. bovei*, *P. caballeroi* et *P. crinita*) (QUEZEL et SANTA, 1962). Un nombre élevé des espèces de ce genre ont une utilisation à des fins aromatiques et thérapeutique. Sur le plan industriel les huiles essentielles isolées de ces plantes sont utilisés comme arômes pour les aliments, comme parfums ou produits cosmétiques (SARIKURKCU *et al.*, 2013).

1.1.2. Usages traditionnels du genre *Phlomis*

Les préparations en thé des parties fleuries de certaines espèces, ont été utilisées pendant des décennies dans la médecine traditionnelle comme remède pour les troubles gastro-intestinaux et pour promouvoir une bonne santé en protégeant les reins, le foie, le système cardiovasculaire, les os, la peau et le cœur (BADER *et al.*, 2015 ; LIMEM- BEN AMOR *et al.*, 2009 ; LI *et al.*, 2017). De plus, elles sont utilisées comme stimulants, toniques, analgésiques et cicatrisants des plaies (LI *et al.*, 2010 ; BADER *et al.*, 2016). Selon SARIKURKCU *et al.*, (2013), elles sont utilisées aussi comme carminatifs, apéritifs, andiurétiques et se sont avérées efficaces pour le traitement des ulcères et des hémorroïdes (YALÇINA *et al.*, 2006).

1.1.3. Etude phytochimique du genre *Phlomis*

Il est connu que les plantes possèdent des métabolites dites « secondaires » par opposition aux métabolites primaires constitués de protéines, glucides et lipides. Ces composés, ceux du métabolisme secondaire, diffèrent en fonction des espèces. Bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (ARIF, 2009).

A ce sujet, les espèces du genre *Phlomis* ont été étudiées. Il ressort de ces études que les principaux métabolites secondaires du genre sont constitués des flavonoïdes, des phénylétanoïdes, (CALIS *et al.*, 1988 ; ANDARY, 1993), les iridoïdes glycosides, les triterpénoïdes (STICHER, 1977 ; HOLZEL, 1997).

1.1.4. Activités biologiques du genre *Phlomis*

Des parties de *Phlomis* à savoir : les racines, les graines et les fleurs sont utilisées soit en infusion, en décoction ou en jus et les fleurs douces de certaines espèces (*Phlomis purpurea* Subsp, *Phlomis cephalotes*) sont consommées directement ou aspirées (LIMEM-BEN AMOR *et al.*, 2009).

Divers activités pharmacologique ont été signalées de certaines espèces tel que l'activité anti-inflammatoire, antioxydantes, antidiabétique, anticancéreuse, antiallergique, et antimicrobienne, ainsi qu'un effet antinociceptif et immunosuppresseur (SARIKUKCU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2010). En plus d'une activité antiparasitaire déterminée par l'espèce *Phlomis brunneogaleata* et *Phomis kurdica* contre *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (LIMEM-BEN AMOR *et al.*, 2009).

1.1.5. *Phlomis bovei* de Noé

1.1.5.1. Description botanique

Phlomis bovei de Noé est une plante médicinale endémique rare, qui croit dans les forêts de montagnes en Algérie. Elle est communément connue sous le nom de Kayat El Djarah qui signifie cicatrisation en arabe. Elle est nommée Farseouan, Tareseouane, Iniji, R'ilefet et Azaref dans le Nord de l'Afrique (IHOUAL *et al.*, 2017).

Phlomis bovei est une plante vivace herbacée qui croit jusqu'à une hauteur de 0,8m. Elle développe souvent une solide base ligneuse. Ses feuilles basales sont en forme de cœur, de couleur verte avec des marges fondues, leur pétiole est de 4 à 18 cm de longueur (LIOLIOS *et al.*, 2007). Les fleurs sont rosâtres de regroupement verticille séré, portant chacune un pétale supérieur fortement courbée (figure 1) (ANONYME 1).



Figure 1 : Espèce *Phlomis bovei* (ANONYME1).

1.1.5.2. Etude phytochimique de *Phlomis bovei*

Les iridoïdes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les lignanes, les néolignanes, les diterpénoides, les alcaloïdes et les huiles essentielles sont des métabolites secondaires typiques du genre *Phlomis* (LI *et al.*, 2010). L'étude phytochimique de l'espèce *Phlomis bovei* a révélée différents métabolites secondaires tels que les tanins (figure 2), les saponines, le mucilage et les huiles essentielles (KHITRI *et al.*, 2014).

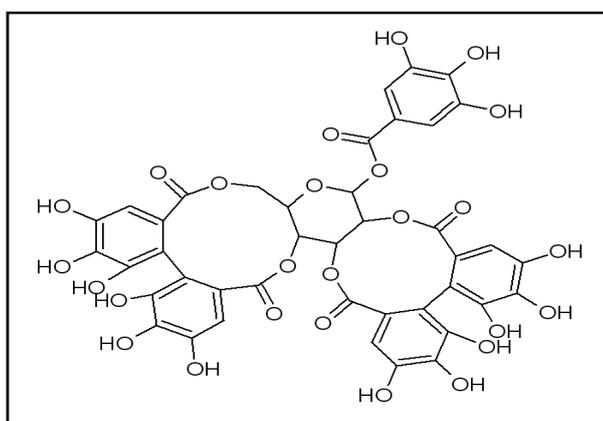


Figure 2 : Structures chimiques de tanin (ANONYME 2).

Les composants de l'huiles essentielles de cette plante ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse qui a permis d'identifier 75 constituants correspondant à 86.37% du poids totale, dont les plus essentielles sont :

germacréne D (21%), β -caryophyllène (7%), β -bournonène (2.9%), thymol(8.3%) et l'hexahydrofarnesyl acétone (5.8%) (LIOLIOS *et al.*, 2015).

1.1.5.3. Activités biologiques de *Phlomis bovei*

Phlomis bovei de Néo est traditionnellement utilisée comme cataplasme pour le traitement des lésions, des infections cutanées et surtout des brûlures (LIMEM-BEN AMORER *et al.*, 2009) et c'est pour cette raison que divers études expérimentales ont été menées pour démontrer les activités biologiques et pharmacologiques de cette plante. En effet, plusieurs études ont approuvés que les huiles essentielles composants la plante sont doués d'une puissante activité antibactérienne avec un large éventail d'inhibition contre divers types de bactéries (LIOLIOS *et al.*, 2015 ; YAHIAOUI *et al.*,2015). Cela peut être attribué à la présence du thymol et le fermacrène D qui sont fréquemment connu pour leur activité antibactérienne (LIOLIOS *et al.*, 2015). D' autre part, les oligoéléments de la plante ont montrées une activité antioxydante et contribuent à la résistance immunitaire. Cette plante pourrait être commercialisée en tant qu'agent antiseptique de fort potentiel (YAHIAOUI *et al.*,2015). Les tannins et les flavonoïdes de *Phlomis bovei* ont montrées eux aussi leurs effets antifongique et antioxydants (WAFA *et al.*, 2016).

1.2. *Verbascum sinuatum*

1.2.1. Généralités sur le genre *Verbascum*

Le genre *Verbascum* communément appelés « mullein» appartient à la famille *Scrophulariaceae* et à l'ordre des Lamiales, il est considéré comme l'un des genres majeurs comprenant 360 espèces et qui est largement répartie entre les régions tropicales et tempérées (SOTOODASH, 2016). Les plantes *Scrophulariaceae* sont généralement à fleurs irrégulières, à corolle de cinq pétales répartis en deux lèvres. Etamine postérieure fréquemment avortée et remplacée par une écaille, parfois deux étamines seulement. Elles sont réparties en deux types, celles à corolle tubuleuse et celles à corolle évasée. C'est à ce dernier type qu'appartient le genre *Verbascum* (OZENDA, 1991). *Verbascum* est un nom dérivé du latin « barbasicum barba» ou « barbe » se référant aux filaments de la plante (RIAZ *et al.*, 2013).

Les plantes de ce genre sont reconnaissables à leurs fleurs jaunes et aux dimensions de leur tige florale qui peut atteindre, voire même dépasser le mètre (ZOGRAFIDIS, 2016).

Quelques unes ont des feuilles très velues, d'autres presque glabres sur la page inférieure. Elles affectionnent toutes les terrains chauds, secs et bien exposés au soleil. On les retrouve parfois même parmi les décombres. Elles fleurissent généralement à partir de mois de juin. Ces plantes dicotylédones pour la plupart bisannuelles et par ailleurs facilement hybridables, sont communément appelées molènes (POLETTI, 1988).

1.2.2. Usages traditionnels de *Verbascum*

Les différentes parties de plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle, elles ont des importances pharmacologiques (Ali *et al.*, 2012). Les feuilles et les fleurs sont utilisées comme mucolytiques, expectorants pour traiter les maladies respiratoires telles que la toux sèche, la tuberculose, la bronchite et l'asthme. Elles sont aussi utilisées comme anti-inflammatoires sur le système urinaire, pour traiter les douleurs rhumatismales, les hémorroïdes, la diarrhée, les infections fongiques et aussi comme sédatif doux (KOZAN *et al.*, 2011 ; NIAZ *et al.*, 2012 et BOGA *et al.*, 2016). Les espèces de *Verbascum* ont des activités inhibitrices contre le virus de la grippe A2 et B, et celui de la leucémie. L'huile fabriquée à partir des fleurs est utilisée pour aider à apaiser le mal des oreilles et peut même être appliquée à l'extérieur pour l'eczéma et d'autres types d'infections inflammatoires (SENER et DULGER, 2009).

Les feuilles et les racines sont utilisées comme antiseptique, antispasmodique, émoullient, antihistaminique et antioxydant (SENATORE *et al.*, 2007). Une activité antiparasitaire contre les trypanosomes a été démontrée récemment par l'espèce *Verbascum sinaiticum* (MERGIA *et al.*, 2016).

1.2.3. Etude phytochimique du genre *Verbascum*

Les espèces du genre *Verbascum* ont été largement étudiées. plusieurs composés bioactifs ont été identifiés a savoir les iridoïdes, les flavonoïdes (Verbacine, verbasitrine), les phényléthanoïdes glycosilés, les triterpène, les saponosides, les polysaccharides des acides phénolique, les glycosides de phytostérol , la digiprolactone et les dérivés aucubin et catalpol (KOZAN *et al.*, 2011 ; DIMITROVA *et al.*, 2012 ; MARCHEV *et al.*, 2016) (figure3). D'autres études antérieurs ont rapportées que aucubin et le verbascoside sont les principaux composés responsables de l'activité anti-inflammatoire. Des hypothèses prétendent que l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne sont directement liés à la teneur en polyphénols (GRIGORE *et al.*, 2013).

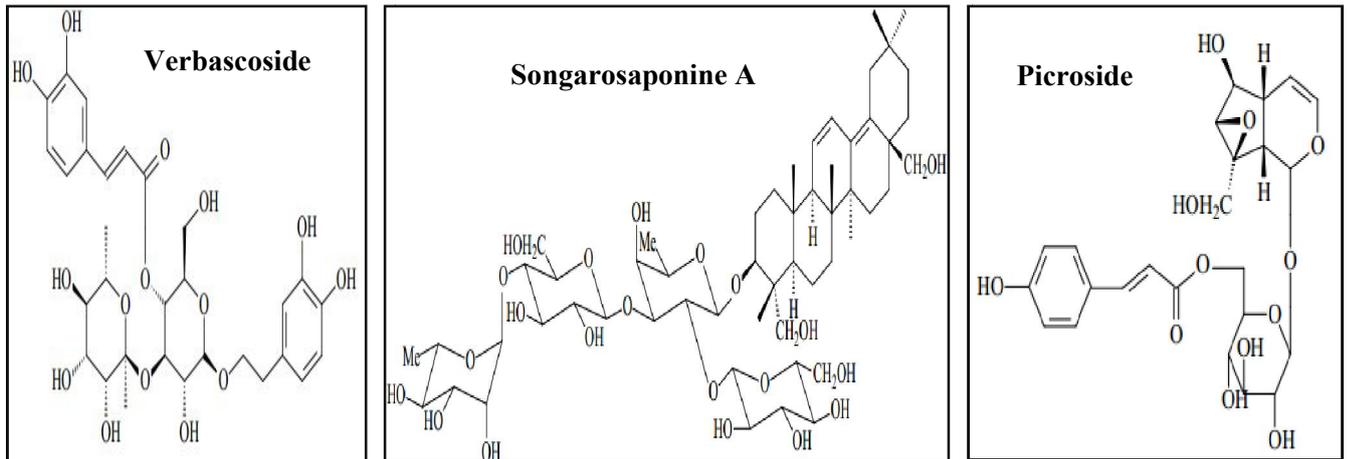


Figure 3 : Quelles structures biochimiques des métabolites secondaires du genre *Verbascum* (ARIF, 2009).

1.2.4. Espèce *Verbascum sinuatum*

1.2.4.1. Description botanique

Communément appelé «molène à feuilles sinuées». Cette espèce est plutôt méditerranéenne, fleurit en mois de juin. Son inflorescence est une grande panicule aux allures de chandelier, portant de très nombreuses fleurs en épis lâches. Le duvet cotonneux tombe très ondulées, surtout celle du rosset basal (figure 4) (ANONYME 3).



Figure 4 : *Verbascum sinuatum* (ANONYME 3).

1.2.4.2. Etude phytochimique de l'espèce *Verbascum sinuatum*

L'espèce *Verbascum sinuatum* contient le plus haut niveau de composés phénoliques, pouvant contribuer à un balayage de radicaux libre, ce que la qualifie d'un antioxydant naturel (MOEIN *et al.*, 2012). Bianco (1981), dans sa recherche systématique des iridoïdes des plantes Scrophulariaceae, a isolé à partir de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Verbascum sinuatum*, outre l'harpagide et l'aucubine, deux autres dérivés de l'aucubine (figure5).

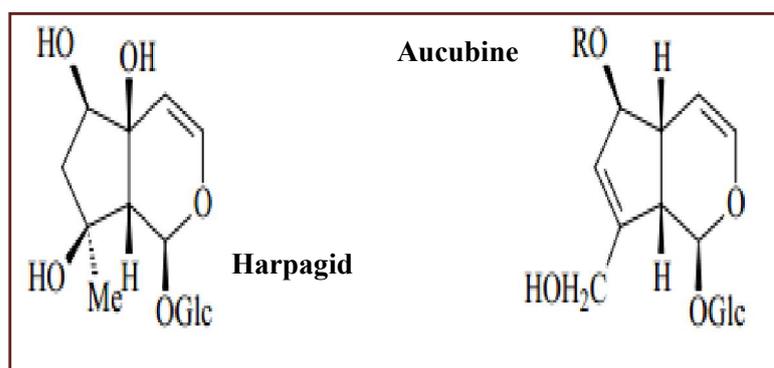


Figure 5 : Structure chimique de l'harpagide et de l'aucubine (BIANCO ,1981).

1.2.4.3. Activités biologiques de *Verbascum sinuatum*

Les feuilles, racines et fleurs de *Verbascum sinuatum* présentent des activités antiseptique, antispasmodique, analgésique, antileischmanique, anticancéreuse, antibactérienne et allopathique (SENATORE *et al.*, 2007).

Les fleurs de *Verbascum sinuatum* L., plante bisannuelle tomenteuse, sont utilisées contre les maladies oculaires. La fleur cueillie le matin avant le lever du soleil ou le soir quand elle est épanouie, est triturée à travers une gaze propre. Le jus est mis à décanter pendant 3 jours et le surnageant est employé en instillation dans les yeux (BOUKEF, 1986).

II .Rappel sur la mitose, les agents antimitotiques et l'effet cytotoxique

2.1. Mitose

Le cycle cellulaire comprend deux phases (MAILLET, 2002) (figure 6) :

❖ **Interphase** qui comprend :

- Une phase de croissance (phase Gap1) durant laquelle la cellule va augmenter en taille et accroître son volume cellulaire. C'est aussi durant cette période qu'elle va synthétiser l'ensemble des protéines spécifiques à son identité ainsi qu'en réponse au milieu dans lequel elle se trouve.

- Une phase de synthèse (phase S) durant laquelle la cellule va répliquer son matériel génétique, l'ADN. La duplication des chromosomes est une étape cruciale pour le maintien de la stabilité génétique. En effet chacun des nucléotides (allant de quelques milliers à plusieurs milliards selon le type d'organisme) doit être dupliqué avec une grande précision afin que les deux cellules filles se voient transmettre la même information génétique.

- Une phase de préparation de la division cellulaire (phase Gap2) durant laquelle la cellule relance la synthèse de protéine et croît rapidement afin de préparer sa division. Cette phase est importante car il existe à cette étape un système de blocage du cycle cellulaire (aussi appelé « checkpoint » ou « point de contrôle ») qui permet de retarder l'entrée en mitose en cas de problème de réplication de l'ADN apparu en phase S ou encore d'éventuel dommage à l'ADN.

❖ **Mitose** (phase M) une des phases crucial du cycle cellulaire au cours de laquelle la cellule se divise pour donner naissance à deux cellules filles strictement semblables.

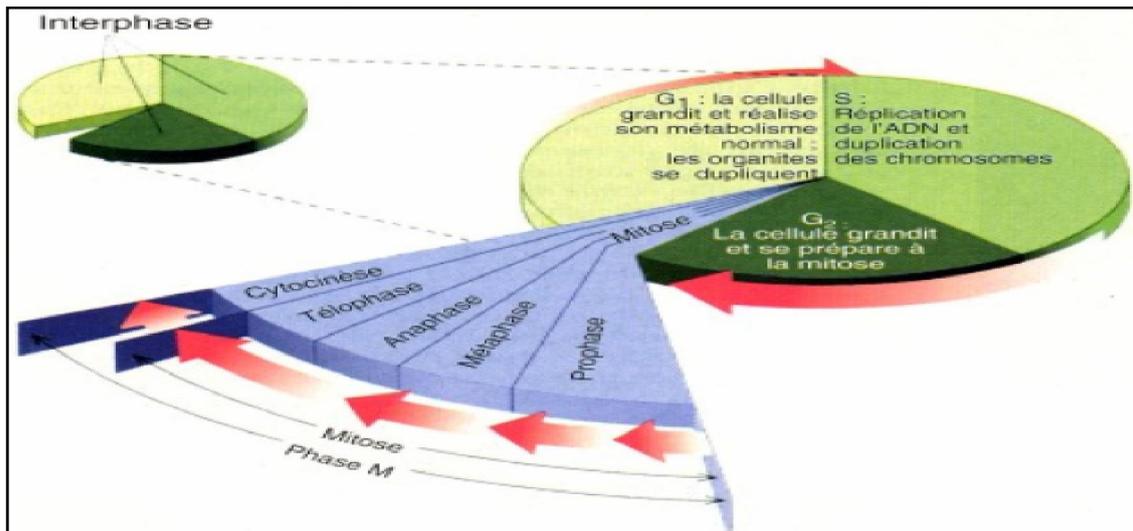


Figure 6 : Différentes phases du cycle cellulaire (KARP, 1998).

2.2. Phases de la mitose

Durant la mitose, la cellule mère se divise en deux cellules filles. C'est un processus relativement bien conservé chez la majorité des cellules eucaryotes. Les grandes phases les composants peuvent donc être décrites de manière commune pour un grand nombre d'organismes, allant de la cellule humaine aux eucaryotes unicellulaires comme la levure (MARY, 2015). Les différentes phases de la mitose sont illustrées au niveau de la figure 7.

- **Prophase** : Il s'agit de l'étape pendant laquelle les chromosomes se condensent sous forme de 2 brins appelés chromatides. Il y a également formation du centrosome sur lequel se fixent les microtubules.
- **Métaphase** : A ce stade chaque chromatide possède une région centromérique d'une longueur variable selon les organismes (BLACK et BASSETT, 2008). Les chromosomes alors attachés aux pôles par l'intermédiaire des microtubules viennent se positionner à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique. Cette étape cruciale de la mitose est régulée par des points de contrôle qui détectent la présence de chromosomes mal attachés et retardent le passage à l'étape suivante.
- **Anaphase** : C'est à ce moment que les deux chromatides se séparent et migrent chacun vers un pôle de la cellule à l'aide des microtubules kinétochoriens qui rétrécissent tandis que les microtubules polaires s'étirent donnant une forme allongée à la cellule (COLOMBEL, 2009).

- **Télophase** : Les microtubules kinétochoriens disparaissent. Deux enveloppes nucléaires se forment autour des chromosomes fils. Les autres microtubules s'allongent jusqu'à la formation de deux cellules filles. Les microtubules sont donc des éléments clés de la cellule. La perturbation de leur instabilité dynamique a pour conséquence de bloquer la division cellulaire en métaphase et ainsi de conduire à l'apoptose de la cellule. Il est donc intéressant d'un point de vue médical de synthétiser des molécules pouvant agir sur cet équilibre (LUCH, 2002).

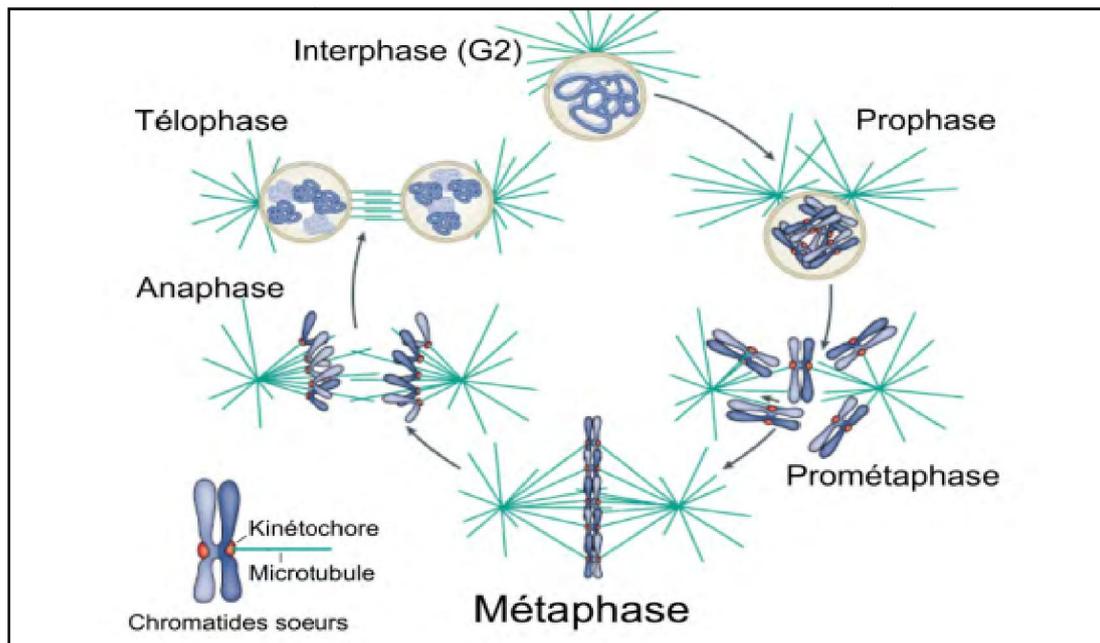


Figure 7 : Différentes étapes de la mitose (CHEESEMAN et DESA, 2008).

En vert : les deux pôles, **en bleu** : les chromosomes.

2.3. Principaux composants de la mitose

Le microtubule est un polymère formé de tubuline, extrêmement dynamique dont les extrémités passent leur temps à basculer entre deux états : la polymérisation (assemblage) et la dépolymérisation (désassemblage). Les deux extrémités étant chargées différemment en GTP et GDP, elles possèdent une dynamique plus ou moins importante. On parle d'extrémité (+) pour celle chargée en GTP et donc très dynamique (coiffée par la tubuline β) et d'extrémité (-) pour celle chargée en GDP donc moins dynamique (coiffée par la tubuline α) (figure8) (MARY, 2015).

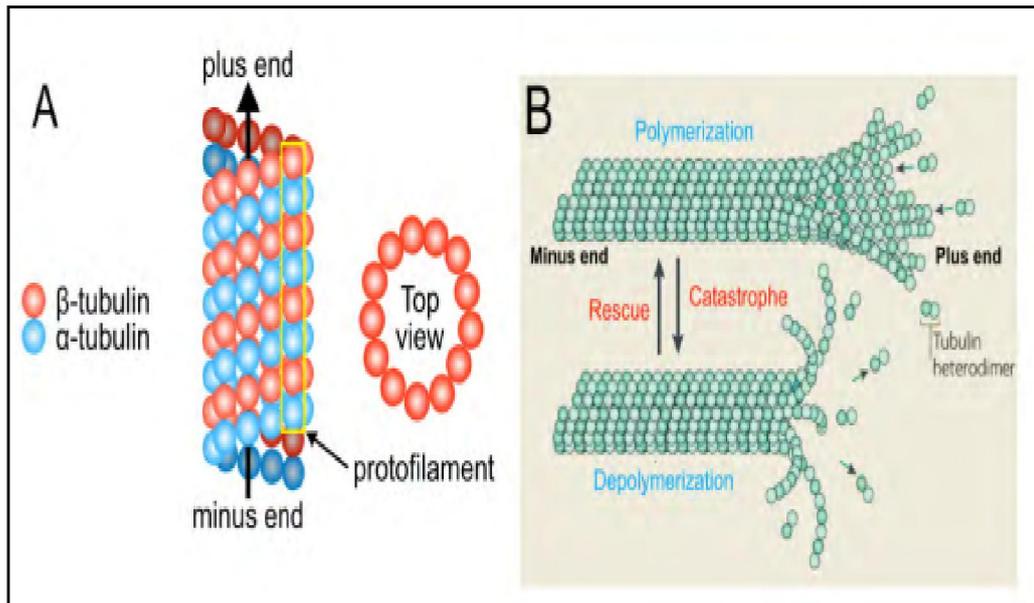


Figure 8 : Structure et dynamique du microtubule.

A) Schéma présentant l'organisation d'un microtubule. **B)** Les microtubules sont des structures hautement dynamiques qui passent très souvent d'un état à un autre (WALCZAK *et al.*, 2010).

Les microtubules sont des protéines du cytosquelette qui participent au maintien de la forme tridimensionnelle de la cellule (MATA et NURSE, 1997). De plus, elles participent aussi de manière active au processus de migration cellulaire ou de transport intra-cellulaire. C'est ainsi qu'il est possible d'apprécier la grande diversité de formes et d'élasticité des cellules composant l'ensemble des organismes connus (MARY, 2015)

Le kinétochore constitué de multiples complexes protéiques (jusqu'à 80 protéines chez les cellules humaines) qui s'assemble durant la prométaphase et joue plusieurs rôles importants au cours de la mitose (figure 9). En plus d'être un acteur essentiel dans le bon déroulement du point de contrôle de la transition métaphase/anaphase (le SAC), il joue aussi un rôle structural dans l'attachement entre le chromosome et les microtubules (MCEWEN *et al.*, 2007).

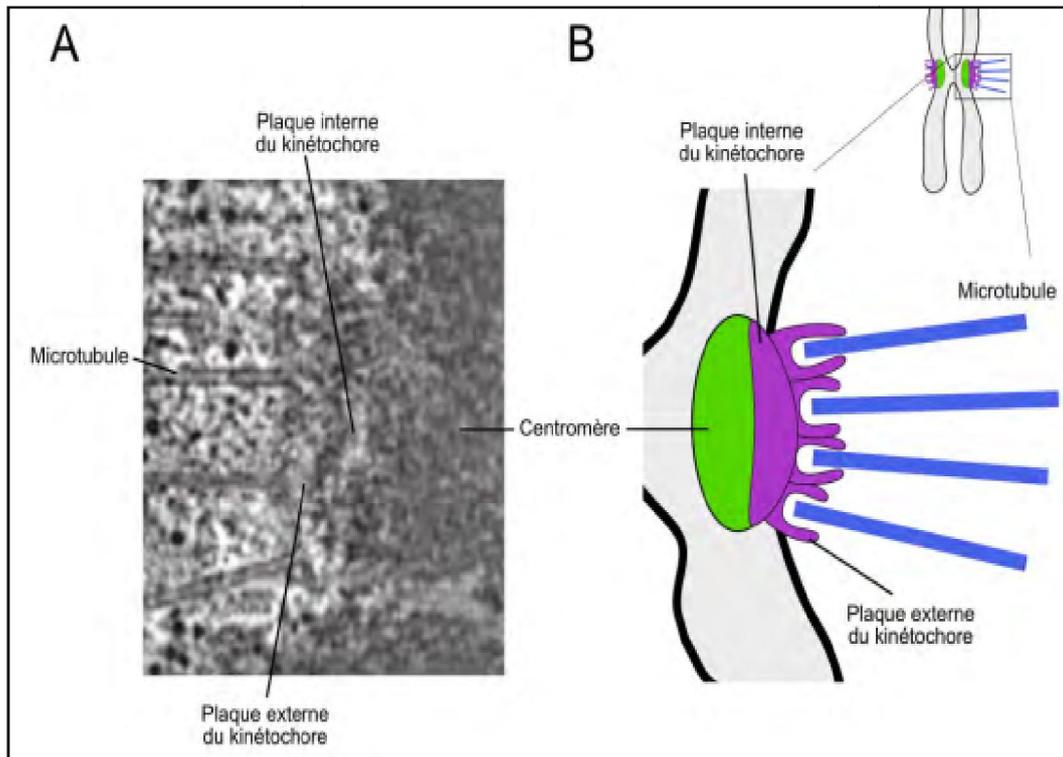


Figure 9 : Structure d'un kinétochore.

A) Vue d'un kinétochore humain de côté par microscopie électronique. **B)** Schéma des différentes plaques d'un kinétochore (MCEWEN *et al.* 2007).

2.4. Agents antimitotiques d'origine végétale

Un certain nombre de composés antimitotiques, qui bloquent la croissance cellulaire au stade de la mitose, agissent en bloquant l'assemblage de la tubuline (YVES, 1993). Ces agents peuvent être des substances végétales, ou des radiations qui à faible concentration sont capables de perturber la division cellulaire empêchant ainsi la formation des deux cellules filles. (MAILLET, 2002 et FASLA, 2009).

2.4.1. Classification et mécanisme d'action des agents antiméiotiques

On compte trois grands groupes de molécules qui se fixent sur la tubuline, à savoir :

2.4.1.1. Les taxoïdes

Les molécules qui se fixent sur la tubuline au site des taxoïdes sont des composés qui stabilisent les microtubules et empêchent ainsi leur dépolymérisation, ce qui a pour effet de stopper le processus de la division cellulaire entre la métaphase et l'anaphase. Cette action ne conduit pas obligatoirement à la mort de la cellule. Ces composés se lient sur la sous-unité β à l'intérieur du tube que forment les microtubules (DABYDEEN *et al.*, 2004 ; ALTMANN, 2007).

Le Taxol est un diterpène qui a été découvert en 1971 (figure 10). Il s'agit d'un composant du tronc de l'if du pacifique *Taxus brevifolia*. Son mode d'action sur les microtubules a été démontré pour la première fois en 1979 par SUAN HORWITZ et ses collaborateurs. Ce composé a reçu l'accord de la FDA pour être utilisé contre le cancer du sein en 1992 puis son utilisation s'est étendue aux traitements pour les cancers des ovaires ou encore des poumons. Du fait de sa faible abondance naturelle, son hémisynthèse est réalisée à partir de la 10-désacétylbaccatine présente dans les aiguilles d'ifs.

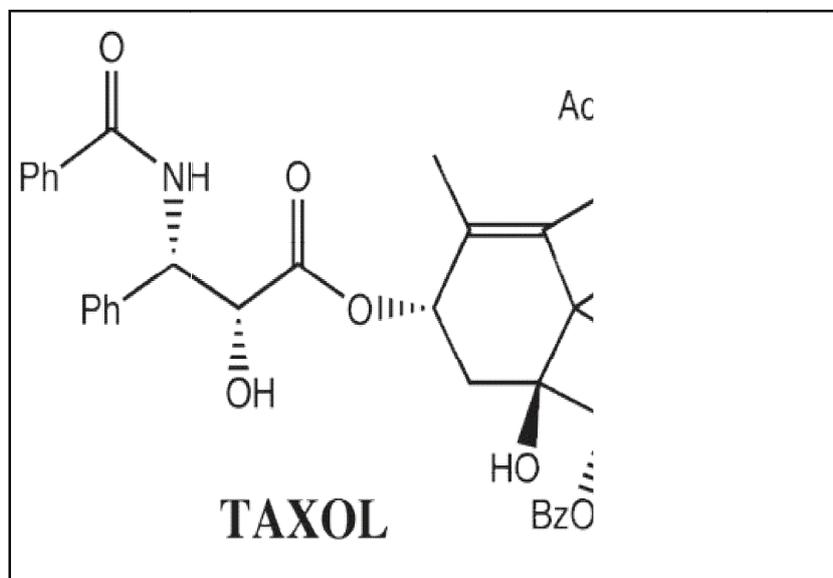


Figure10 : Structure du Taxol (WANI *et al.*, 1971).

2.4.1.2. Les vinca-alcaloïdes

La pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus* G.DON, fait partie de la famille des *Apocynaceae*. Cette plante produit deux principes actifs qui appartiennent à la famille des alcaloïdes (hétérocycles azotés) : la vinblastine et la vincristine. Par ailleurs, il est possible d'obtenir deux autres principes actifs par hémisynthèse de ces deux molécules : la vindésine et la vinorelbine (figure 11) (GUERITTE et FAHY, 2005).

La vinblastine et la vincristine sont deux alcaloïdes bisindoliques tous deux isolés à partir de *Catharanthus roseus*. Ce sont deux composés antimitotiques qui ont pour action d'inhiber la polymérisation de la tubuline en se liant sur la sous unité β au niveau du pôle (+). Afin d'augmenter leur activité de nombreux analogues ont été synthétisés (COLOMBEL, 2009).

D'autres produits naturels se fixent également au même site sur la tubuline, comme ladolastatine.

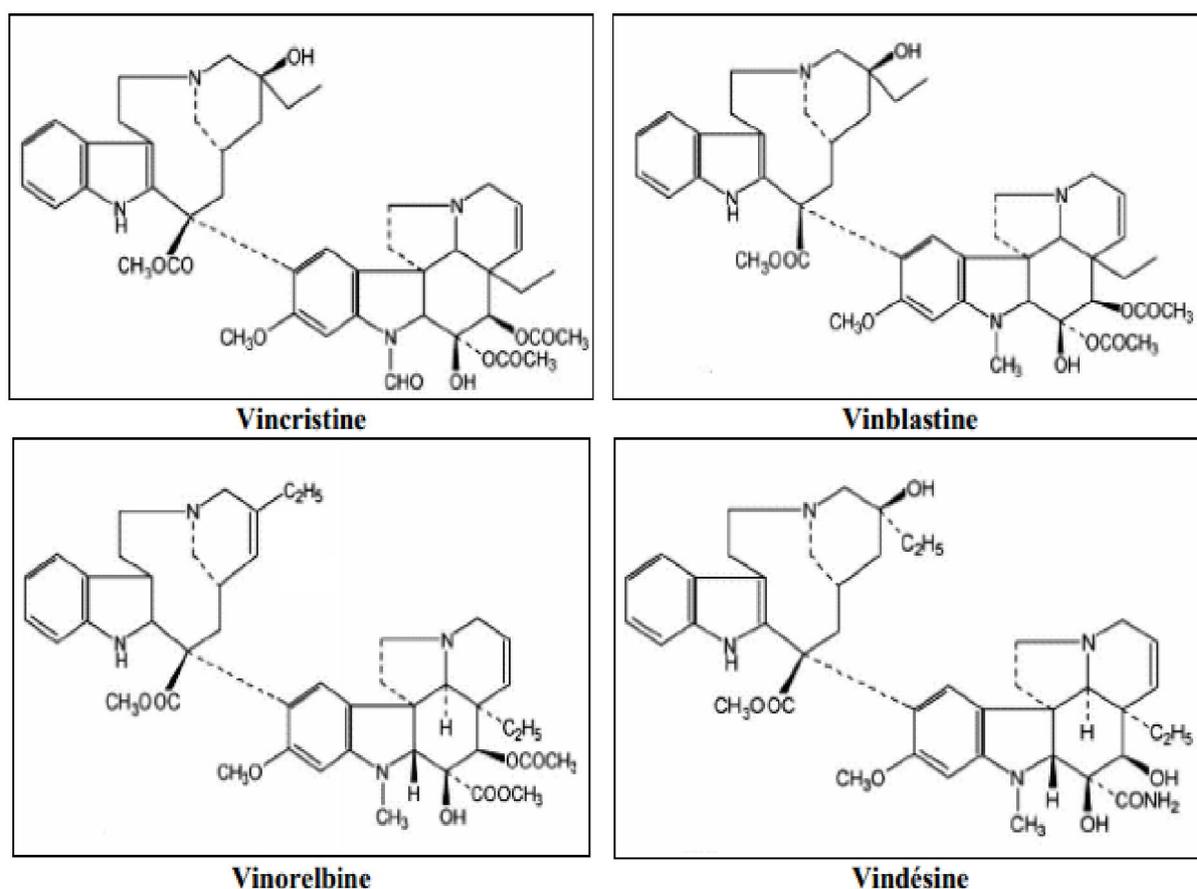


Figure 11 : Structures de quelques vinca-alcaloïdes (HAIT *et al.*, 2006).

2.4.1.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules de structures complexes cycliques et azotées, relativement stables plus ou moins basiques. De façon générale, ces métabolites sont retrouvés au niveau des plantes médicinales. La synthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentre dans la vacuole. Les alcaloïdes sont insolubles dans l'eau. Généralement, ils sont produits dans les tissus en croissance puis sont véhiculés dans les différentes parties de la plante (BRUNETON, 1999).

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Ils peuvent être classés en fonction de leur précurseur. On distingue ainsi trois grandes classes (alcaloïdes vrais, proto-alcaloïdes, pseudo-alcaloïdes) selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent un atome d'azote dans un hétérocycle (BRUNETON, 1999).

L'alcaloïde le plus utilisé comme molécules bioactives est la colchicine, qui est le premier composé antimittotique naturel à avoir été découvert (figure 12). Cette molécule est extraite des tiges souterraines charnues du colchique *Colchicum autumnal.L* (Liliaceae), qui en se fixant sur une molécule de tubuline empêche sa polymérisation en microtubules (FASLA, 2009). Le site d'action de la colchicine est sur la sous-unité β à l'interface avec la sous-unité α de la tubuline. L'absence ou l'insuffisance des microtubules entraîne le blocage de la division cellulaire au stade métaphase, l'inhibition de la motilité cellulaire et le transport intracellulaire des vésicules et des organites (GARRETT et GRISHAM, 2000).

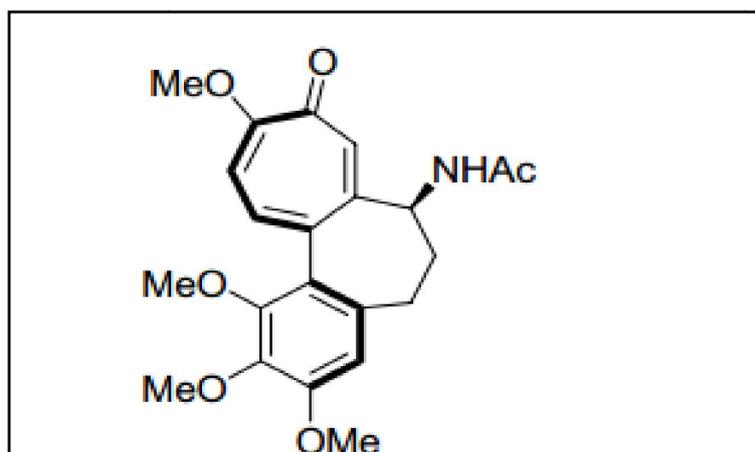


Figure12 : Structure chimique de la colchicine (ALLAIN, 2005).

Plusieurs familles de composés naturels sont connues pour se lier sur le même site que la colchicine (figure13). La famille des combrétastatines dont la combrétastatine A-4 est l'une des molécules les plus actives, les allocolchicinoïdes comme le N-acétylcolchinol B, les podophyllotoxines ou encore la famille des stéganes dont la stéganacine ont fait l'objet de plusieurs études *in vitro* sur l'aspect antimitotique (COLOMBEL, 2009).

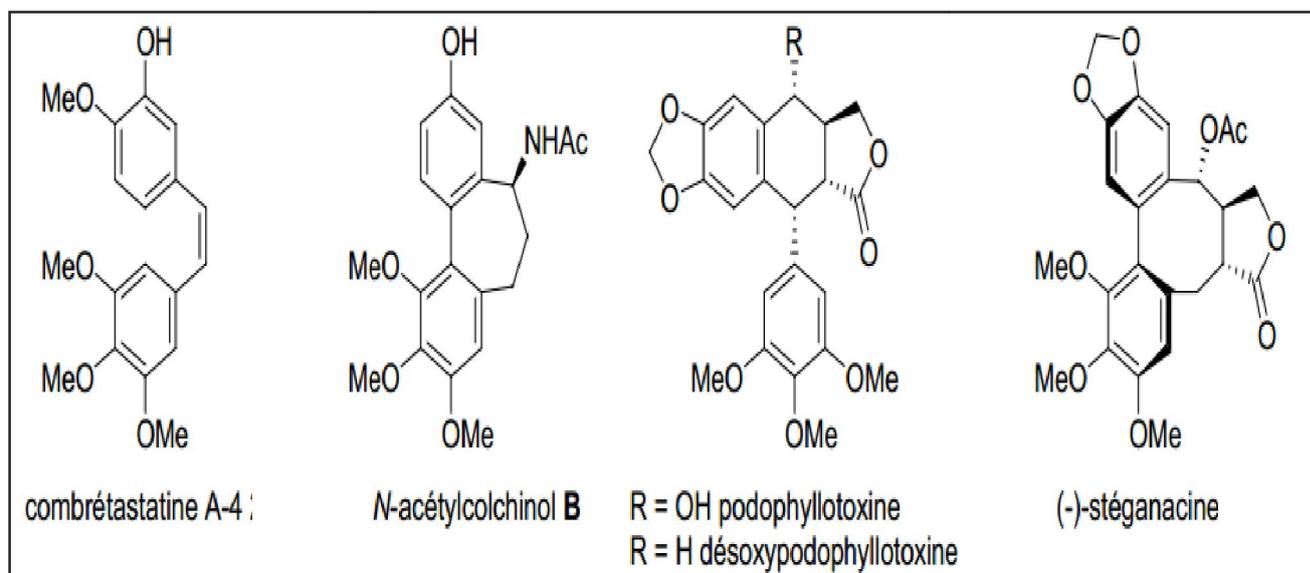


Figure 13 : Structures de quelques alcaloïdes. (SACKETT, 1993)

2.5. Effet cytotoxique des molécules d'origine végétale

La mort cellulaire reste une des préoccupations essentielles de la toxicologie moderne. Elle est particulièrement importante dans les études *in vitro*, pour comprendre ou prévoir les effets toxiques observés *in vivo*. Sur le plan moléculaire, des modifications de la structure des molécules biologiques, causées par l'interaction directe ou indirecte avec l'agent toxique, peuvent être détectées. Sur le plan biologique, ce sont les altérations fonctionnelles des cellules et leur retentissement sur l'homéostasie de l'individu qui sont observées (BENAMAR, 2009).

L'observation du fait que des dommages cellulaires sévères, provoqués par divers toxiques, n'entraînent pas obligatoirement la mort de toute la population cellulaire exposée, montre que d'autres facteurs de protection et de réparation, particuliers à chaque cellule, sont à prendre en compte. Ce n'est que lorsque ces défenses cellulaires sont débordées qu'un

processus dégénératif s'installe, aboutissant à la mort cellulaire. La cellule peut mourir par deux types de processus distincts : La nécrose et l'apoptose (BENAMAR, 2009).

2.5.1. Molécule à effet cytotoxique

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui appartiennent à la famille des polyphénols qui compte presque 8000 composés polyphénoliques naturels (STALIKAS, 2007). Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (VERHOEYEN *et al.*, 2002 ; LUGASI *et al.*, 2003), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) (URQUIAGA et LEIGHTON, 2000) . Ils sont des phénylbenzo-pyrones (phénylchromones). Leur structure moléculaire comprend deux noyaux aromatiques, A et B, liés par un hétérocycle oxygéné C (figure 14).

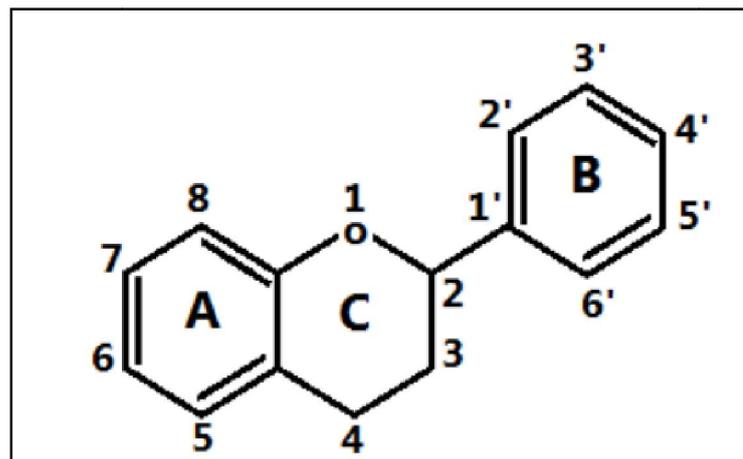


Figure 14 : Structure générale d'un flavonoïde (HEIM *et al.*, 2002).

Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés à partir de sources végétales (HARBORNE et WILLIAMS, 2000 et BOUMENDJEL *et al.*, 2002). Structurellement, ils se répartissent en quinze familles, dont les plus importants sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavannonols, les isoflavones, les isoflavannones, les chalcones et les anthocyanes (FORMICA et REGELSON, 1995 et BRUNETON, 2009).

Les effets biologiques bénéfiques des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Une meilleure connaissance de cette dernière est indispensable pour expliquer leurs effets

protecteurs contre plusieurs maladies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, et les cancers (STOCLET et SCHINI-KERTH, 2011).

La quercétine (figure 15) est un flavonoïde, qui se trouve naturellement dans une grande variété d'aliments incluant les oignons rouges, jaunes, les pommes, des baies, le thé noir, les brocolis, certaines graines et des fruits oléagineux comme les noix. L'activité anticancéreuse de la quercétine a été largement étudiée. En 1989, un rapport a constaté qu'elle inhibait la PI 3-kinases, induit un arrêt de cycle cellulaire en G1 par inhibition des activités des CDK2 et CDK4 (CASAGRANDE et DARBON, 2001).

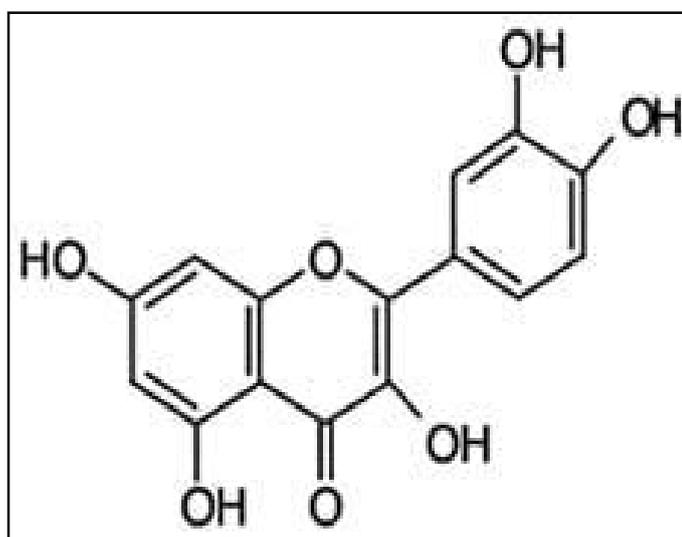
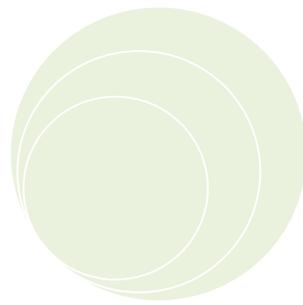
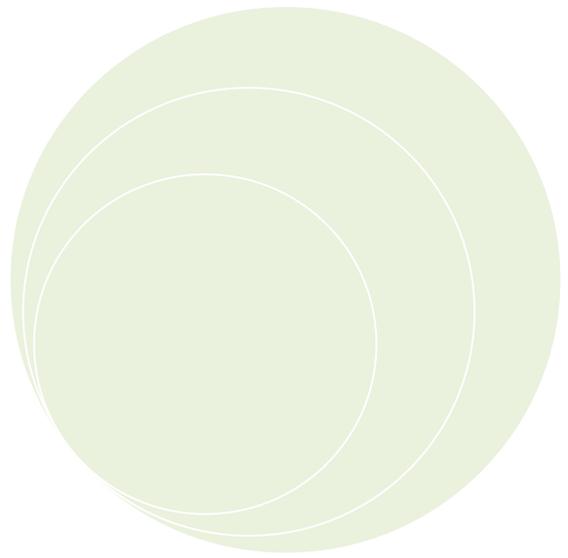
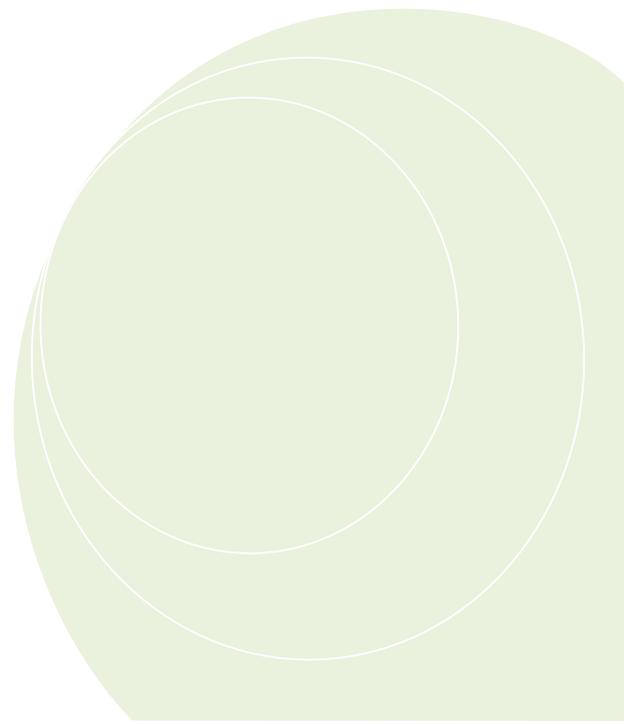


Figure 15 : Structure chimique de la quercétine (HEIM *et al.*, 2002).



PARTIE
EXPERIMENTALE



I. Matériels et méthodes :

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) : Unité de Microbiologie, de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Notre étude a portée sur deux espèces de plante médicinales : *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum* de l'ordre des Lamiales.

Nous nous sommes intéressés sur l'effet antimittotique et l'effet antiprolifératif des extraits aqueux obtenus à partir des feuilles de ces plantes. Ces effets ont été évalués respectivement sur des cellules méristématiques d'*Allium cepa* en analyse microscopique, et sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* en analyse spectrophotométrique.

1.1. Matériel :

1.1.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal étudié est constitué de feuilles des deux plantes médicinales *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*, récoltées dans la région d'Addekar Asif El Hemmam de Bejaia en Mai 2017.

1.1.2. Préparation des racines d'*Allium cepa*

Les bulbes d'oignon (*Allium cepa*) ont été mis à croître dans l'eau pendant quelques jours (3 à 5 jours) (figure 16), afin d'avoir une croissance des racines qui vont servir pour l'activité antimittotique.



Figure 16 : Bulbes d'*Allium cepa* misent à croître dans de l'eau.

1.1.3. Préparation du milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae*

Le milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae* est naturellement acide (pH 3.8) permettant la croissance de celle-ci. Ce milieu est préparé à partir des éléments séparés énumérés au niveau de l'annexe 1.

Les éléments ont été mélangés (bactopeptone, glucose, eau distillée stérile, tampon phosphate pH 3.8, Na_2HPO_4 , acide citrique), ensuite agiter et chauffer pendant quelques minutes pour les dissoudre et les homogénéiser. Le milieu obtenu a été réparti dans des flacons et autoclavé pendant 20 min à 120°C afin d'éliminer tout les germes intempestifs susceptibles de contaminer le milieu. Puis conserver au réfrigérateur à +4°C.

1.1.4. Description de la cellule de Malassez

La cellule de Malassez (ou Hématimètre de Malassez) est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Cette méthode de dénombrement permet de compter les cellules vivantes et mortes dans une solution. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant 20 petits carrés. La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles et son volume total est de 1 mm³.

1.1.5. Préparation de la suspension de *Saccharomyces cerevisiae*

Pour la mise en culture de la *Saccharomyces cerevisiae*, quelques graines de levure lyophilisée commercialisée ont étéensemencées dans des boîtes Pétri contenant le milieu de culture précédemment préparé à pH 3.8, et incubé à 28°C pendant 24h. Après incubation la suspension de levure obtenue a été diluée à l'aide du milieu de culture et standardisée à une densité optique entre 1.6 à 1.8 à une longueur d'onde de 650nm (Annexe 2).

La densité optique de la suspension de levure déterminée par spectrophotométrie était de 1.67, on suite on détermine le nombre des cellules correspondant à cette densité optique en utilisant la cellule de Malassez qui a permis le comptage des cellules de levure à l'aide de l'équation suivante :

$$N = n / V \times F$$

Dont :

- ✓ **N** : c'est le nombre de cellules formant colonie par ml (UFC /ml)
- ✓ **n** : nombre de cellules comptées
- ✓ **V** : le volume de comptage (ml)
- ✓ **F** : le facteur de dilution

1.1.6. Description de la plaque stérile

Une plaque stérile en polystyrène transparent contenant 12 puits (alignés en 4 rangées x 3 colonnes), avec couvercle, et un volume utile de chaque puit est de 2ml a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antiproliférative des extraits aqueux foliaires de deux plantes médicinales.

1.1.7. Réactifs et solutions

Les réactifs utilisés pendant l'activité antimototique et antiproliférative sont énumérés dans le tableau I en dessus :

Tableau I : Réactifs et solutions utilisés pour l'activité antimittotique et l'activité antiproliférative.

Réactifs/ solutions	concentration	Utilisation	Rôle
Colchicine	1mg/ml	Activité antimitotique	Empêchent la formation du fuseau mitotique.
Carmin acétique	0.5mg de poudre de carmin + 45ml d'acide acétique + 55mL d'eau distillée		Obtention d'un bon contraste entre les chromosomes colorés en magenta et le cytoplasme qu'est incolore.
Solution de fixation	3volume d'éthanol + 1 volume d'acide acétique		A pour but de bloquer toute évolution de division cellulaire et permet de conserver l'intégrité structurale de chromosome.
Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium	1mg / 10ml MTT (10%)	Activité Antiproliférative	Elle consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, qui réduit les sels de tetrazolium présents dans le MTT en cristaux de formazon.
DodécylSulfate de Sodium (SDS)	1g/ 10ml SDS (10%)		Dissocier les cristaux formés pour pouvoir compter par la suite le nombre des cellules mortes et vivantes.
Quercétine	10mg+ 5ml d'eau distille stérile		Inhibe la prolifération des cellules.

1.1.8. Petits matériels

En plus de matériels cités on s'est servie de d'autres matériels de laboratoire pour la mise en œuvre de notre travail : flacons en verres, éprouvettes, erlenmeyers, entonnoir, tubes a vis, lames et lamelles, pinces, coupelles en verre de pyrex, micropipettes et embouts stériles, papier Whatman, microfiltres a seringues stériles de $0,22\mu\text{m}$, cotons, agitateurs magnétiques, vortex, four Pasteur.

1.1.9. Appareillages

Pour la mise en œuvre de l'activité antimittotique on s'est basé sur l'utilisation de microscope optique (figure 17), et pour la mise en œuvre de l'activité antiproliférative on utilisés le spectrophotomètre (figure 18).



Figure 17 : Microscope optique.



Figure 18 : Spectrophotomètre.

1.1.10. Analyse statistiques

Afin d'analyser statistiquement les données de cette étude, le programme Excel et la version 7.1 du logiciel Statistica ont été utilisés, ainsi que des différents tests statistiques (Man Whitney, ANOVA de Cruskal-Wallis, comparer une moyenne a un standard).

II. Méthodes

2.1. Activité antimitotique

Pour la détermination de l'activité antimitotique de nos extraits aqueux végétaux nous nous sommes basés sur les travaux de KWAN YUET PING *et al* (2012) avec quelques modifications.

2.1.1. Préparation des extraits aqueux des feuilles de plantes médicinales

Les feuilles de *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum* sont nettoyées, séchées à l'ombre et à température ambiante (25°C). Ces feuilles sont broyées pour les réduire en une sorte de poudre. 5g de poudre de feuilles de chacune des plantes sont macérés dans 50ml d'eau distillée pendant 24h à température ambiante sous agitation et à l'abri de la lumière. Les macéras obtenus sont ensuite filtrés par du coton. On obtient ainsi un extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* et de *Verbascum sinuatum*. Ces extraits végétaux obtenus sont conservés à l'abri de la lumière et au le réfrigérateur (4°C) pour des usages ultérieurs.

2.1.2. Mise en œuvre de l'activité antimitotique

De jeunes racines de bulbes d'oignon sont mises en contact pendant 24 h à température ambiante avec des différentes dilutions (1/2, 1/4 et 1/8) de chaque extrait aqueux préalablement préparé (figure19). Un témoin positif (constitué de racines mises en contact avec la colchicine à 1mg/ml) et un témoin négatif (constitué de racines mises en contact avec de l'eau distillée) sont également réalisés.

Après 24h d'incubation les cellules racinaires sont fixées puis colorées avec du carmin acétique. Enfin, on les observe avec le microscope optique (×400), pour déterminer le nombre de cellules en division, et calculer l'indice mitotique (IM).

L'indice mitotique (IM) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Indice mitotique (\%)} = \left[\frac{\text{Nombre de cellules en division}}{\text{Nombre totale des cellules}} \right] \times 100$$

PARTIE EXPERIMENTALE

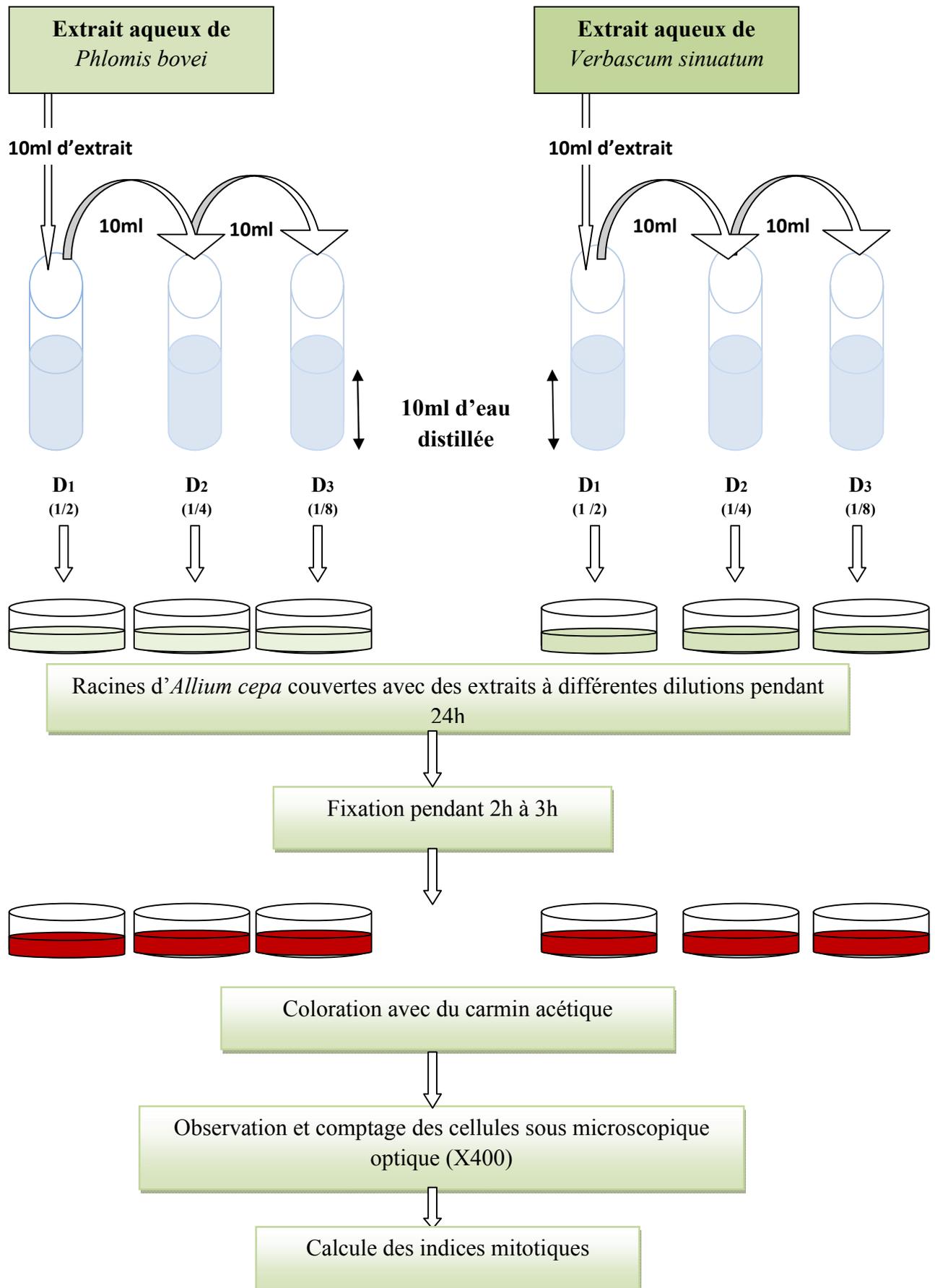


Figure 19 : Différentes étapes de la mise en évidence de l'activité antimutagène.

2.2. Activité antiproliférative - MTT

Le protocole utilisé pour mettre en évidence l'activité antiproliférative est celui de HOSSEINPOUR *et al* (2013) avec quelque modification.

Les extraits aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum* ont été testés pour leur effet antiprolifératif vis-à-vis d'un organisme eucaryote connu pour son pouvoir prolifératif rapide : *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette partie consiste à préparer une plaque stérile contenant les témoins (milieu de culture de la levure et la quercétine), et les extraits aqueux de feuilles des deux plantes. Les absorbances ont été mesurées par spectrophotométrie à 560nm (Annexe 3). Le taux de viabilité est déterminé ce que nous permet de déduire le taux de mortalité.

2.2.1. Principe de MTT

La technique du MTT [3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl tetrazolium bromide] est une méthode colorométrique appliquée pour la quantification de la viabilité cellulaire (MOSMANN, 1983 et CARMICHAEL *et al.*, 1987). Elle consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, qui réduit les sels de tetrazolium présents dans le MTT en cristaux de formazon (figure 20). Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Il suffit donc après l'incubation des cellules avec du MTT pendant un certain temps à 37 °C (environ 3h) de dissoudre le précipité dans du SDS. Une simple mesure de la densité optique à 560 nm par spectrophotométrie permet de déduire le pourcentage de viabilité cellulaire.

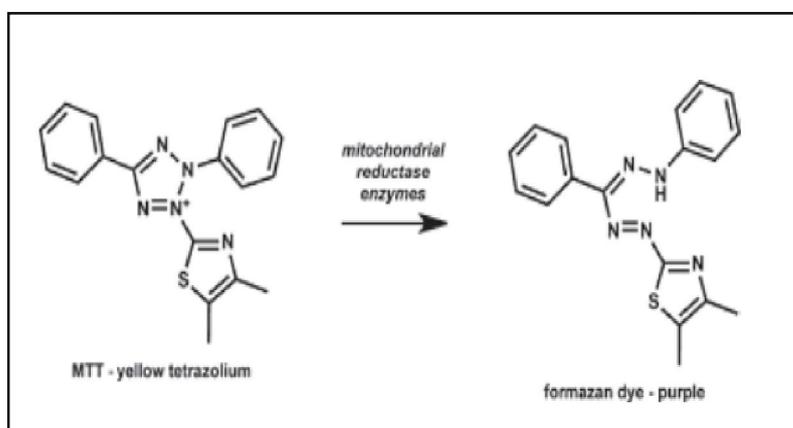


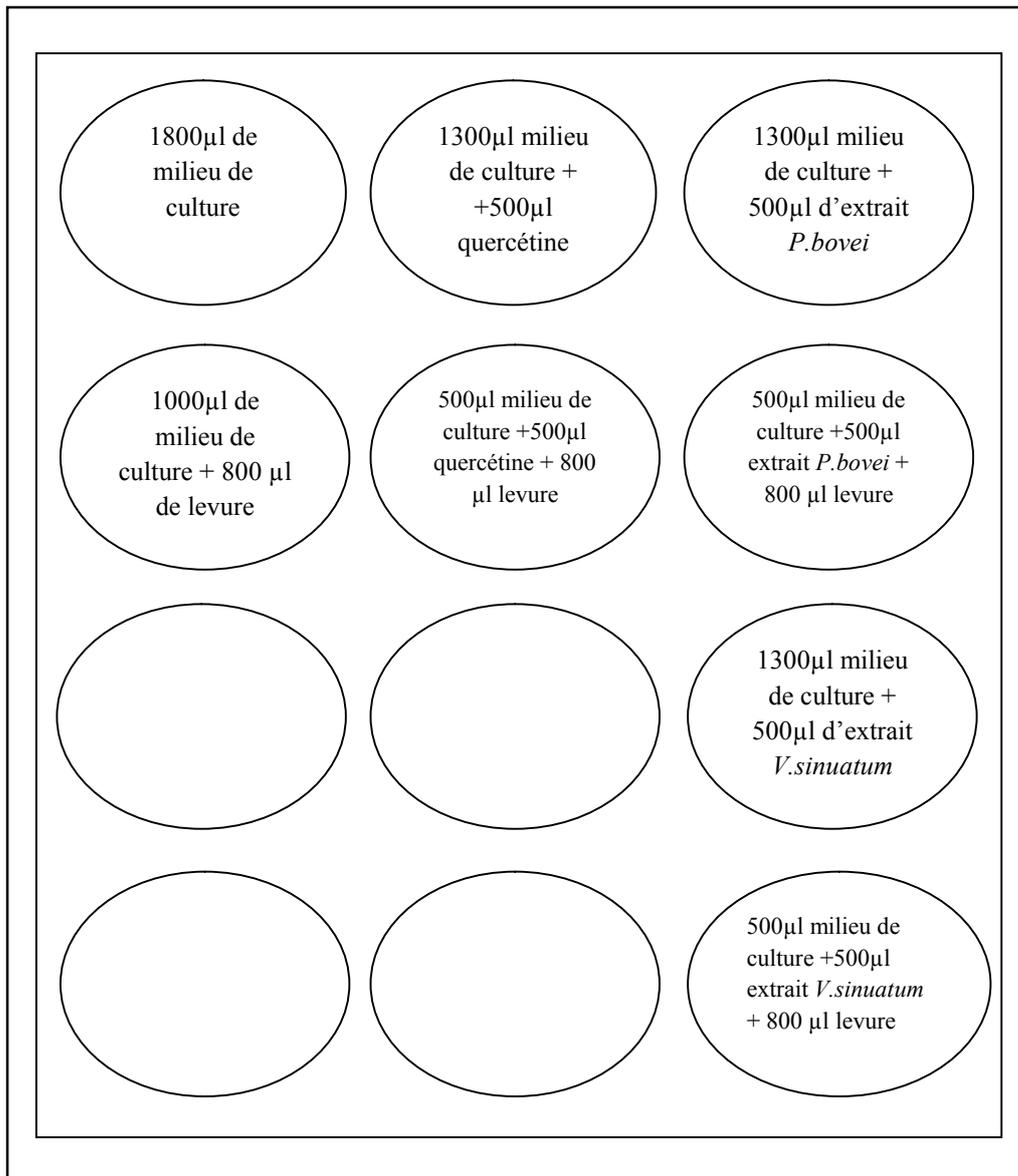
Figure 20 : Réaction chimique de la conversion du MTT en formazan (MOSMANN, 1983).

2.2.2. Préparation de la plaque stérile

Nos manipulations ont été réalisées dans des conditions stériles afin d'éviter toutes contaminations bactériennes tout le long du travail (figure 21). Les extraits végétaux ont été filtrés à l'aide d'un microfiltre stérile de $0.22\mu\text{m}$ pour éliminer tout les contaminants susceptibles d'altérer nos échantillons. La plaque stérile présentée en figure 22 a été préparée et incubée a température ambiante sous agitation pendant 24h. Après 24h on rajoute dans tous les puits $200\mu\text{l}$ de MTT (10%) et laisser incubé à 37°C pendant 3 h. on rajoute $700\mu\text{l}$ de SDS (10%) et on laisser agir pendant 30min à température ambiante. le contenu de chaque puit est transvasé dans une cuve. Les densités optiques ont été mesurées par spectrophotométrie à 560nm contre un blanc pour chaque échantillon utilisé. La quercétine (10%) a été utilisée comme témoin positif et milieu de culture éprouvé de cellules de levure est utilisé comme témoin négatif.



Figure 21 : Préparation de la plaque stérile.



← Levure et son blanc (T-) ← Quercétine et son blanc (T+) ← Les extraits et leurs blancs

Figure 22 : Préparation de la plaque stérile de l'activité antiproliférative- MTT.

III. Résultats et discussions

3.1. Activité antimittotique

Nos résultats indiquent les indices mitotiques obtenus pour les différentes dilutions des deux extraits aqueux (*Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*) ainsi que les indices mitotiques obtenus pour les deux témoins (Colchicine et eau distillée) (figure 23).

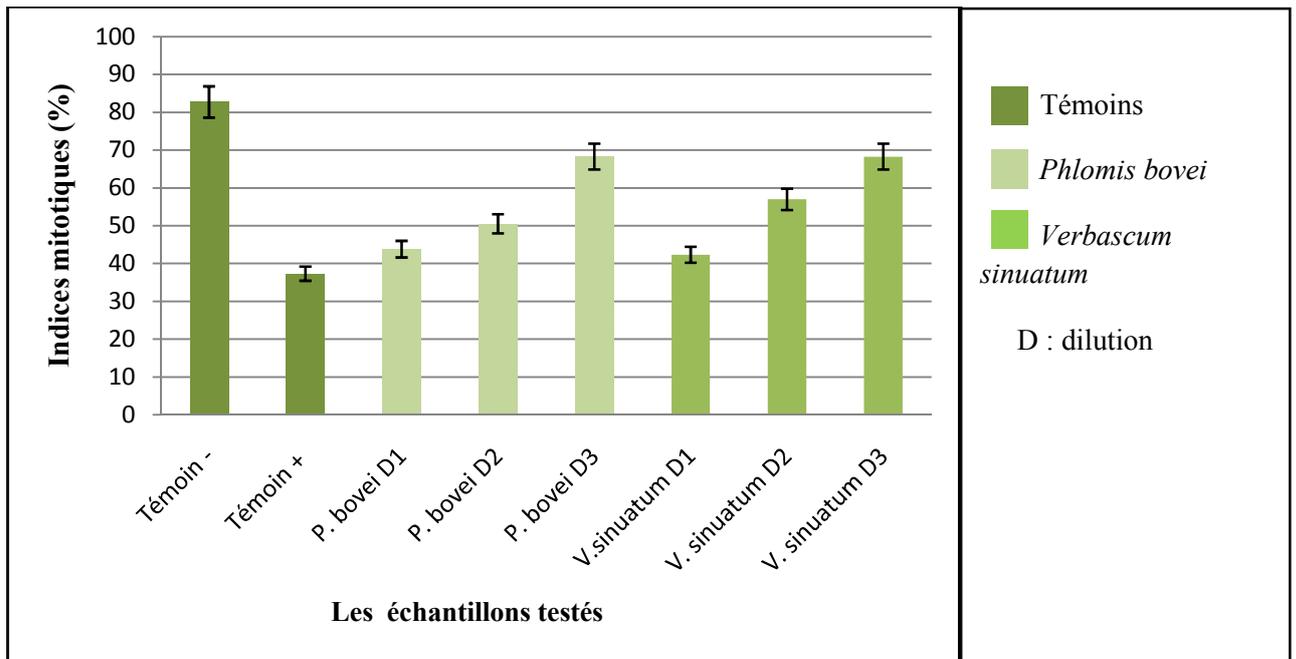


Figure 23 : Indices mitotiques des différents extraits testés.

Les indices mitotiques obtenus sont regroupés dans le tableau II. Ces résultats obtenus révèlent que :

- L'IM de *Phlomis bovei* était de $43.788 \pm 2.220\%$ à la dilution 1/2 et qui est le plus proche du témoin positif ($37.310 \pm 1.923\%$). Par ailleurs, à la dilution 1/4 l'IM était de $50.512 \pm 4.000\%$, pour atteindre un pourcentage de 68.284 ± 1.398 à la dilution 1/8 qui est proche de témoin négatif ($82.720 \pm 2.320\%$).
- L'IM de *Verbascum sinuatum* était de $42.296 \pm 1.544\%$ à la dilution 1/2 et qui est le plus proche du témoin positif ($37.310 \pm 1.923\%$). Par ailleurs, à la dilution 1/4 IM était de $56.970 \pm 1.970\%$, pour atteindre un pourcentage de 68.274 ± 1.224 à la dilution 1/8 qui est proche de témoin négatif ($82.720 \pm 2.320\%$).

- Les IM obtenus pour les extraits aqueux de *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum* se rapprochent entre eux. L'analyse statistique type « ANOVA de Cruskal-Wallis » entre les indices mitotiques des deux plantes a révélée des différences non significatives ($p > 0,05$) (annexe 4).

Tableau II : Différents indices mitotiques des extraits testés.

Indice mitotique (% ± ES)			
Témoin	Eau distillé (T-)	82.720 ± 2.320	
	Colchicine (T+)	37.310 ± 1.923	
Plantes	<i>Phlomis bovei</i>	D1/2	43.788 ± 2.220
		D1/4	50.512 ± 4.003
		D1/8	68.284 ± 1.398
	<i>Verbascum sinuatum</i>	D1/2	42.296 ± 1.544
		D1/4	56.970 ± 1.949
		D1/8	68.274 ± 1.224

D : dilution

ES : Erreur Standard

- Les IM retrouvés pour le témoin négatif indiquent une division normale des cellules méristématiques d'*Allium cepa* avec les quatre différentes phases de la mitose à savoir : prophase, métaphase, anaphase et la télophase (figure 24).

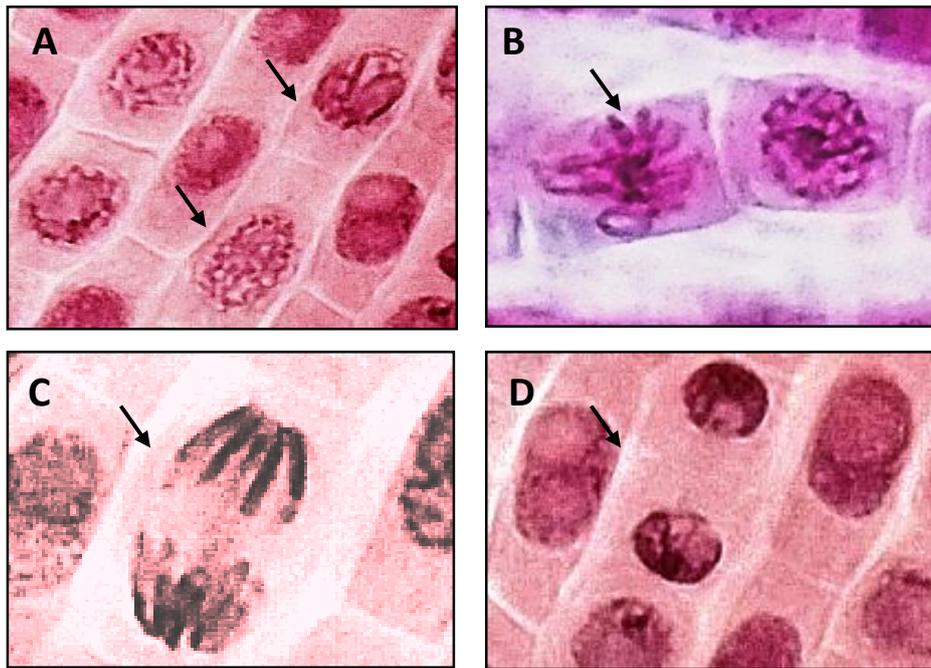


Figure 24 : Différentes étapes de la division cellulaire observées dans les racines méristématiques d'*Allium cepa*

(A) Prophase, (B) Métaphase, (C) Anaphase, (D) Télaphase X720).

Les plantes supérieures telles que *Allium cepa* sont acceptées comme des modèles génétiques admirables pour évaluer des effets génotoxiques tels que des aberrations chromosomiques et des perturbations du cycle mitotique. Résultats des courantes études ont reflétés l'utilité des extrémités racinaires des cellules d'*Allium cepa* pour surveiller les effets génotoxiques des extraits des plantes (KWAN *et al.*, 2012). Le test d'*Allium cepa* a permis l'évaluation des différents paramètres génétiques, qui sont les indices mitotiques et l'aberration chromosomique. L'IM est considéré comme un paramètre d'estimation de la division cellulaire (MARCANO *et al.*, 2004). Par conséquent, la diminution de l'indice mitotique des cellules méristématiques d'*Allium cepa* pourraient être interprétées comme la mort cellulaire (RANK et NIELSEN, 1997).

Par ailleurs les IM retrouvés pour le témoin positif ont été les plus faibles comparativement au témoin négatif, générant ainsi des anomalies chromosomiques et cellulaires. La figure 25 indique la présence d'agglutinations, des allongements cellulaires avec des micronoyaux, qui sont les aberrations les plus observées au niveau des cellules méristématiques traitées par la colchicine. D'autres anomalies chromosomiques ont été

observées tel que les ponts chromosomiques et la fragmentation des chromosomes au niveau des cellules.

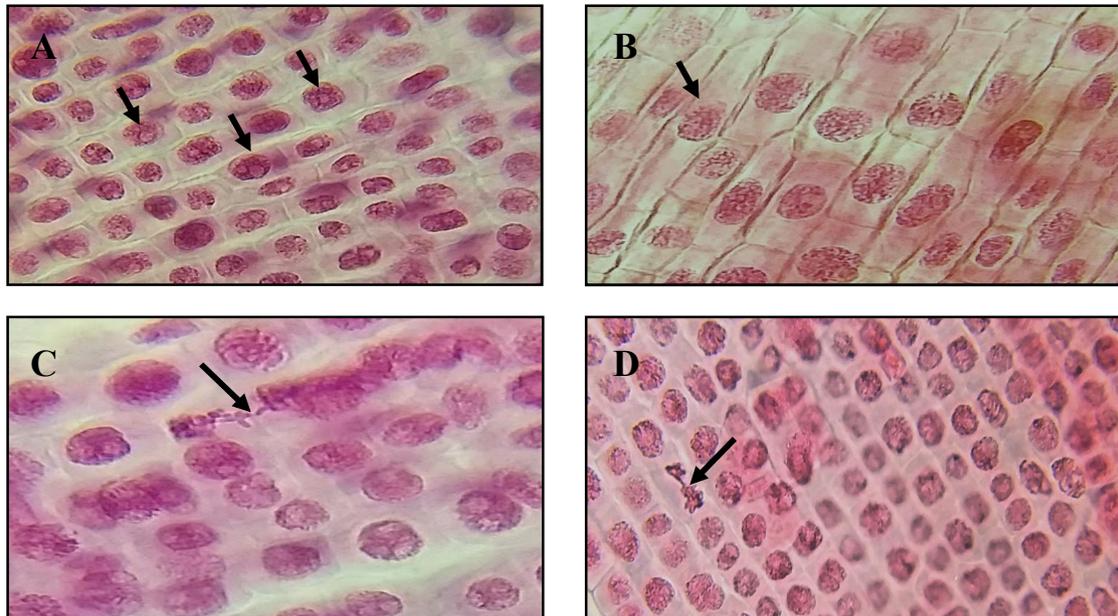


Figure 25 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la colchicine.

(A) Agglutination des chromosomes, (B) Allongement des cellules et rétrécissement du noyau, (C) Désorganisation chromosomique, (D) Pont chromosomique (X400).

La diminution de l'IM chez les cellules méristématiques racinaire d'*A. cepa* traitées avec de la colchicine indique un effet mitodépressif de cette dernière. De pareils effets mitodépressifs ont été observés chez les cellules méristématiques racinaire d'*Allium cepa* traitées avec des différentes concentrations en extraits aqueux de plantes médicinales *Phlomis bovei*, et de *Verbascum sinuatum*. L'analyse statistique type «Mann Whitney» entre les indices mitotiques du témoin positif et négatif a révélée des différences hautement significatives ($p < 0.05$), ce que confirme l'effet inhibiteur de la colchicine dans la division cellulaire (annexe 5).

Ce protocole date de 1938 avec les premiers travaux réalisés sur les cellules racinaires d'*Allium cepa* en étudiant l'effet antimitotique de la colchicine (LEVAN, 1938). C'est un alcaloïde extrait des tiges souterraines du colchique ; *Colchicum autumnale* (FASLA, 2009). Elle est utilisée couramment dans le traitement de différentes tumeurs tissulaires. Son action

se résume par blocage de la formation du fuseau mitotique (VERDIER-PINARD, 2001). En se fixant sur une molécule de la tubuline, elle empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance de ces dernières entraîne un blocage de la mitose au stade de métaphase (GARRETT et GRISHAM, 2000). Cette approche confirme nos résultats de obtenus dans cette étude par la colchicine.

Pour les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec les extraits aqueux des deux plantes médicinales à différentes dilutions, indiquent que leurs IM augmentent en diminuant la concentration en extrait aqueux. La figure 26 et la figure 27 montrent les différentes anomalies observées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par les extraits aqueux de *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*, regroupant les agglutinations, fragmentations des chromosomes, cellules gigantesques à petit noyaux, allongement des cellules et rétrécissement du noyau, et désorganisation des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale à la métaphase.

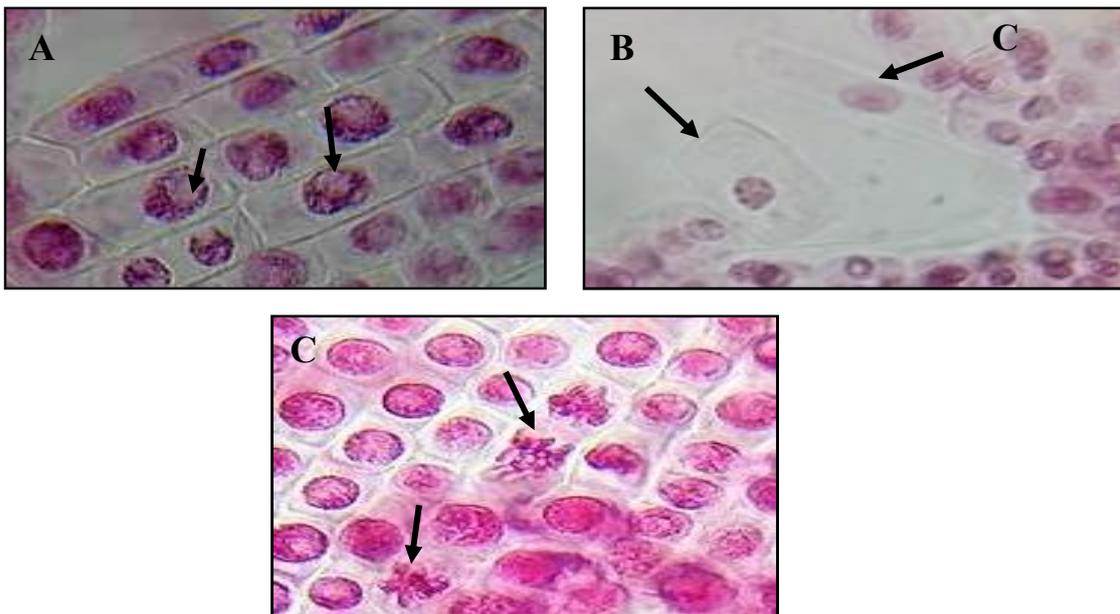


Figure 26 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par l'extrait aqueux des feuilles de *Phlomis bovei*.

- (A) Agglutination des chromosomes, (B) Cellules gigantesque a petit noyaux, (C) Allongement des cellules et rétrécissement du noyau, (D) Désorganisations des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale à la métaphase (X400).

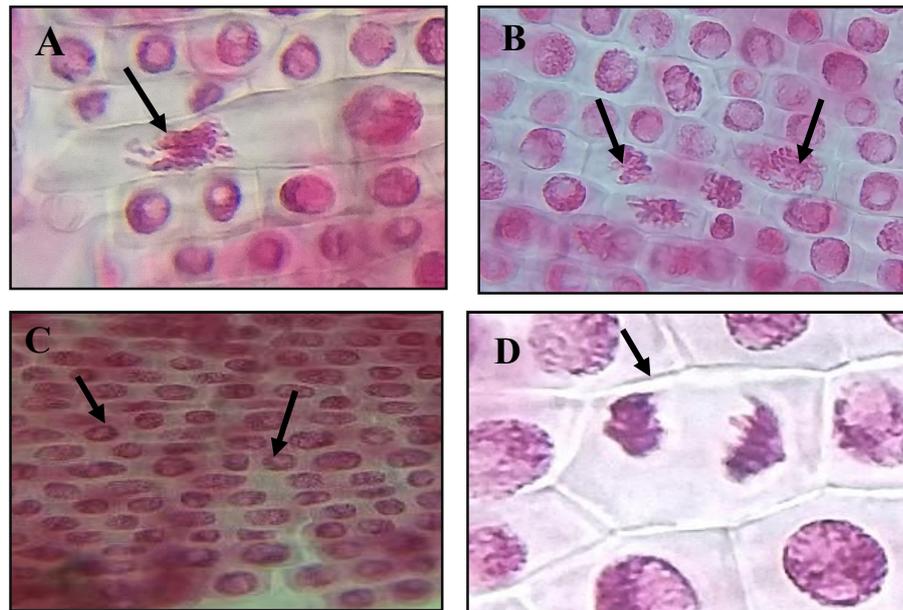


Figure 27 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées dans des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux de feuilles de *Verbascum sinuatum*.

(A) Allongement des cellules et désorganisation des chromosomes, (B) Désorganisation chromosomique lors de la métaphase, (C) Agglutination des chromosomes, (D) Agglutination chromosomique lors de l'anaphase (X400) (X720 pour D).

On pourra suggérer que les extraits aqueux de plantes médicinales qu'on a testés ou bien leurs composants doivent interférer avec le développement normal de la mitose, en provenant un nombre de cellules d'entrer en prophase et bloquant ainsi le cycle mitotique durant l'interphase (EL-GHAMERY *et al.*, 2000) . Des résultats similaires ont été obtenus pour des infusions de *Maytenus ilicifolia* Mart. et de *Bauhinia candicans* Benth (COMPAPATO *et al.*, 2002), et aussi des même résultats ont été obtenu pour l'extrait *Euphorbia hirta* (KWAN *et al.*, 2012). L'analyse statistique type « Comparer une moyenne à un standard » entre les indices mitotiques des témoins et les extrait aqueux de plantes a révélée des différences hautement significatives ($p < 0.05$), ce que confirme l'effet inhibiteur différent des extraits testés dans la division cellulaire (Annexe 6, 7, 8,9).

La réduction de l'IM pourrait être due à l'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 phase G2 et S (WEBSTER et DAVIDSON, 1969).

Les effets mitodépressifs de certains extraits de plantes ont la capacité de bloquer la synthèse de l'ADN et des nucléoprotéines (MEREYKETLY et STEPHEN, 1980 ; SCHULZE et KIRSCHER, 1996). Selon SIDDIQUI *et al.* (2007), la diminution de l'indice mitotique est due probablement à une modification ou une altération dans l'expression de certains gènes.

Chaque action survenant séparément dans le noyau interphasique par l'influence ultime de la structure des chromosomes durant la division cellulaire, doit être aussi la cause de la réduction du nombre des autres stades (AKINBORO et BAKARE, 2007).

D'après DEYSSON (1956), les phénomènes de l'inhibition préprophasique ou prophasique sont classés par ordre de brutalité croissante :

- Le premier degré est caractérisé par une action qui se manifeste uniquement avant la prophase ;
- Le second degré est défini par une diminution de l'IM en même temps que l'augmentation des proportions des prophases et des télophases, par le fait que la durée de ces deux stades soit allongée ;
- Le troisième degré est déterminé par une inhibition de l'entrée en prophase et un blocage des prophases commencées qui, peu à peu, reviennent à l'état interphasique. Ceci expliquerait probablement l'apparition des vides nucléaires rencontrés chez les cellules d'*Allium cepa* L.

De tels phénomènes ont été observés par WADA (1939) et D'AMATO (1949), et sont particulièrement nets sous l'influence de l'antipyrine ou l'effet se traduit par une disparition progressive des métaphases, anaphases, et télophases avec une augmentation relative du nombre de prophases qui, finalement restent seuls puis disparaissent peu à peu, par retour à l'état interphasique.

D'après ARNAUD-LAMARDELLE (1955), il ne serait rigoureux de parler d'inhibiteur préprophasique car les inhibiteurs n'empêchent pas la préprophase mais seulement le passage de cette dernière à la prophase vraie.

L'augmentation du nombre de prophases doit probablement être reliée à une intense altération de microtubules en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade métaphase (FUSCONI *et al.*, 2006). HOSHINA (2002) explique que l'augmentation de l'indice

mitotique des cellules traitées par rapport au témoin est le résultat de l'accroissement de la division cellulaire incontrôlable voir à des formations tumorales.

Quand l'IM mitotique diminue en dessous de 22% du témoin il provoque ce qu'on appelle « effet létal » sur les organismes test (ANTONSIE-WICZ, 1990). Une diminution de l'IM de 50% par rapport au témoin est habituellement un effet sublétal (PANDA et SAHU, 1985) et est nommée « valeur limite de cytotoxicité » (SHARMA, 1983). Selon ces deux définitions on pourra déduire que les extraits aqueux de *Phlomis bovei* et de *Verbascum sinuatum* sont considérés comme létaux pour les cellules d'*Allium cepa* à la dilution 1/2, et comme sublétaux à la dilution 1/4 et 1/8.

La présence des cellules gigantesque à petit noyaux est observée chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par les extraits aqueux de *Phlomis bovei* par rapport au témoin. Ces petits noyaux peuvent être originaires des fragments acentriques formés suite à des cassures chromosomiques ou chromatidiques. Ils peuvent être le résultat de chromosomes en retard durant l'anaphase, ou encore à partir du cycle cellulaires (MÜLLER et STREFFER, 1994). Selon TÜRKÖGLÜ (2008), la formation de petits noyaux implique des pertes dans le matériel génétique.

La présence des ponts chromosomiques chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par les extraits aqueux de plantes médicinales en anaphase pourraient être provoqués durant la translocation d'échange chromatidique inégal ou dus à la présence de chromosomes dicentriques. Ces ponts causent des mutations chromosomiques structurales (EL-GHAMERY *et al.*, 2000 et KONUK *et al.*, 2007).

La fréquence de l'aspect rétrécis et contracté des noyaux est assez importante chez les cellules méristématiques traitées par les extraits aqueux de plantes médicinales est probablement au changement dans la structure ou la composition de la membrane nucléaire (GABARA *et al.*, 2006).

3.2. Activité antiproliférative- MTT

La prolifération cellulaire a été évaluée en utilisant le test MTT modifié par nos soins. On a observé un effet inhibiteur pour certains extraits aqueux testés. Le tableau III montre les résultats obtenus lors de la détermination du taux de viabilité et l'estimation du taux de mortalité des extraits aqueux testés.

Tableau III : Les résultats des taux de mortalité du témoin et des extraits végétaux aqueux.

		Taux de viabilité (%)	Taux de mortalité (%)
Témoin	Quercétine	85.94	14.06
Echantillons	<i>V. sinuatum</i>	100	00
	<i>P. bovei</i>	89.81	10.19

Les résultats obtenus révèlent que la quercétine a un effet antiprolifératif qui traduit sa cytotoxicité à l'égard des cellules de levure avec un taux de mortalité de 14,06%. Par ailleurs l'échantillon de levure traité avec *Verbascum sinuatum* n'avait aucun effet antiprolifératif sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (00%). Cependant les cellules de levure traitée avec l'extrait aqueux des feuilles de *Phlomis bovei* a donné un pourcentage de mortalité proche de celui du témoin (10.19%).

Nous avons évalués la cytotoxicité et la viabilité cellulaire des extraits aqueux de deux plantes médicinales vis-à-vis des cellules de levures en utilisant une technique d'évaluation *in vitro* (test MTT), qui est connue par sa simplicité de mise en œuvre, sa spécificité, sa sensibilité, et qu'est privilégiée par rapport aux technique utilisant ces modèle *in vivo* (EISEIVBRAND, *et al.*,2002). Cette technique est la première méthodes colorimétriques appliquée pour la quantification ou de la prolifération cellulaire (DENIZOT et LANG, 1986 ; CARMICHAEL *et al.*, 1987) .

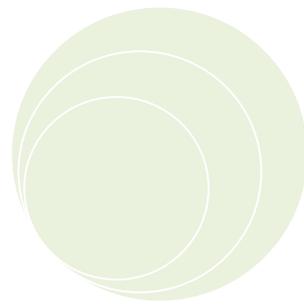
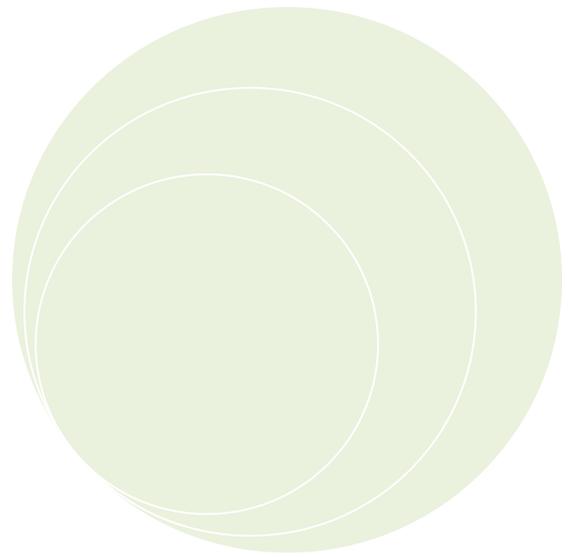
Nous avons utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* lyophilisée pour la mise en évidence de l'activité antiproliférative des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*. Qui est un modèle dans la compréhension des processus biologiques les plus complexes. Grace à elle, PAUL NURSE, LEE HARTWELL et TIM HUNT ont pu découvrir les molécules clés de la régulation de la division cellulaire ; ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 2001 (SCHWOB, 2001). De plus *Saccharomyces cerevisiae* a

l'avantage de se reproduire spontanément ce qui permet d'évaluer sa croissance cellulaire (MINTON et ADAMSON, 1979 et LAMBERT *et al.*, 1993).

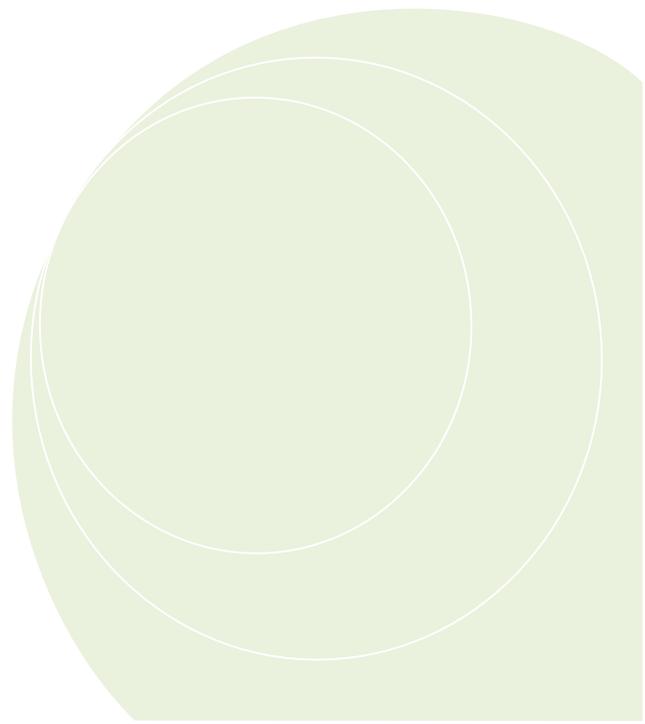
L'effet cytotoxique des extraits aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* et de *Phlomis bovei* n'est pas trop étudié. Nos résultats indiquent que l'extrait aqueux des feuilles de *Phlomis bovei* inhibe la croissance et diminue la survie des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* à un pourcentage modéré de 10,19 %. Le même effet a été démontré par IHOUAL *et al.* (2017) avec ces travaux réalisés avec le test MTT qui a révélé une diminution de 18% de la viabilité des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* exposées à des extraits de feuilles de *Phlomis samia*.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet antiprolifératif et cytotoxique des extraits de plantes sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'une des plantes utilisées à des fins thérapeutiques est *Matricaria chamomilla* qui est riche en flavonoïdes et en terpénoïdes. L'extrait hydroalcoolique de cette plante à des concentrations de 3000µg/ml inhibe significativement la croissance et diminue la survie des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'à 48%(SRIVASTAVA et GUPTA, 2009). Ceci est dû à la présence des molécules bioactives. Des études antérieures montrent que les saponosides ont une activité antiproliférative et cytotoxique (DRISSI *et al.*, 2006). Et aussi l'effet antiprolifératif de *Phlomis samia* a été évalué en utilisant un test MTT, après incubation d'extrait de *Phlomis samia* pendant 48 h, 72 h. Les effets d'inhibition de MDA (Malondialdéhyde), sur les cellules HepG2 (cellules hépatocellulaires du foie) ont été observées et comparés avec le groupe témoin. Le test *in vitro* a montré que l'extrait d'herbe présente de forts effets antiprolifératifs sur les deux cellules cancéreuses. Il y avait une diminution de 18% des cellules de viabilité après 72 h de traitement par rapport à celles de 48 h.

L'activité antiproliférative des composés extraits à partir de *Verbascum thapsus* (10-désoxyeucommiol, saponines, herbagozide, lutéoline, apigetrine, 3-O-fu-lopyb ransylasailogenine F et ningpogénine) ont été évaluées en utilisant des cellules de cancer du poumon A549 par un test MTT (HE *et al.*, 2007). Les résultats indiquent que les composés lutéoline et 3-O-fucopyranosylsailogénine F présentaient une certaine activité antiproliférative qui induit à l'apoptose des cellules de cancer du poumon A549 .par ailleurs les autres composés testés à savoir 10-désoxyeucommiol, saponines, herbagozide, lutéoline, apigetrine ne présentaient pas d'effet antiprolifératif évident (ZHAO *et al.*, 2011).



CONCLUSION GENERALE



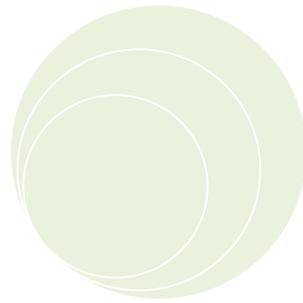
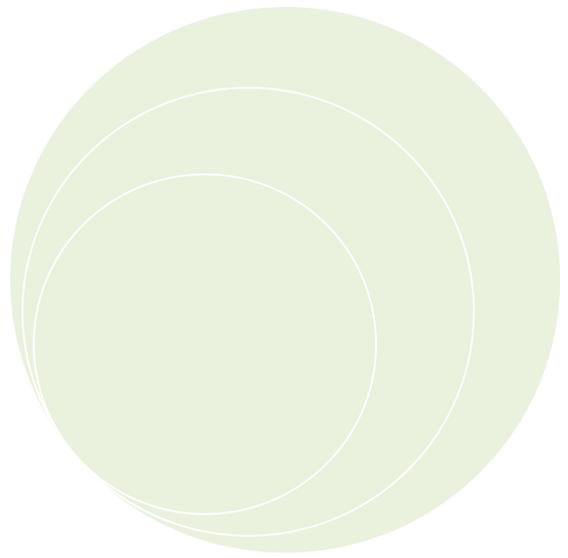
Dans le cadre de la mise en évidence des nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre le cancer, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet antimittotique et antiprolifératif des feuilles de deux plantes méditerranéennes utilisées en médecine traditionnelle : *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*.

L'étude antimittotique réalisée sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa* L. montre que les extraits aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* de Néo et *Verbascum sinuatum* provoquent des troubles de perturbations et d'inhibitions de la mitose par un dysfonctionnement du fuseau mitotique, induisant ainsi l'accumulation des cellules aux stades prophasiques. Cette perturbation est accompagnée d'anomalies chromosomiques et cellulaires à savoir des agglutinations des noyaux, des cellules gigantesques, des allongements cellulaires avec des petits noyaux, et des fragmentations chromosomiques.

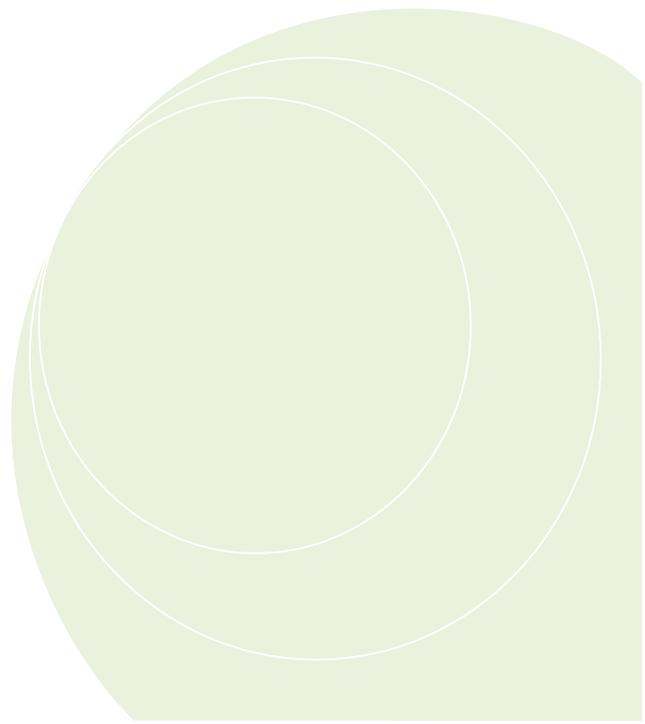
Par ailleurs, l'étude de l'activité antiproliférative a montrée un effet modéré de l'extrait aqueux de *Phlomis bovei* de Néo sur la prolifération des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* avec un pourcentage de mortalité 10,19. Par contre l'extrait de *Verbascum sinuatum* n'a présenté aucun effet antiprolifératif.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet et pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Réaliser des autres extractions avec d'autres solvants ;
- Déterminer la composition détaillée des extraits aqueux des plantes étudiées.
- Purifier les molécules bioactives ;
- Déterminer *in vivo* de l'effet antimittotique et antiprolifératif ;
- Elargir le panel des activités biologiques par d'autres tests : antioxydantes, anti-inflammatoires, et anticoagulants.



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AKINBORO A. and BAKARE AA. (2007).** Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470–475.
- **ALI N., ALI SHAH SW., SHAH I., AHMED G., GHAS M., KHAN I. and ALI W. (2012).** Anthelmintic and relaxant activities of *Verbascum Thapsus* Mullein. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:29.
- **ALLAIN P. (2005).** Les médicaments. *In* <http://www.pharmacorama.com/lelivre.php> (Consulté le 28/05/2018).
- **ALTMANN K H. and GERTSCH J. (2007).** *Nat. Prod. Rep.* 24, 327-357.
- **AMAS. (1997).** *Food and Agricultural Research Council*, Réduit, Mauritius.
- **ANDARY C (1993).** Caffeic acid glycoside esters and pharmacology. *In*: SCALBERT A. Ed. *Polyphenolic phenomena*. INRA Ed., Paris, p 237-255.
- **ANTONSIE-WICZ D. (1990).** Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of the Ledakrin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 28, 79-96.
- **ARIF S. (2009).** Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum* : *V. ballii* et *V. dentifolium*. Université El Hadj Lakhdar-Batna. Thèse.
- **ARNAUD-LAMARDELLE P. (1955).** Recherches sur quelques problèmes relatifs à l'action des substances cinéto-classiques et mitostatiques et à leur utilisation. Thèse de Doctorat ès Sciences inédite, Poitiers, p. 211. dactylographiées. *In* DEYSSON G (1956).
- **BADER A., TUCCINARDI T., GRANCHI C., MARTINELLI A., MACCHIA M., MINUTOLO F., DE TOMMASI N. and BRACAB A. (2015).** Phenylpropanoids and Flavonoids from *Phlomis kurdica* as Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase. *Phytochemistry*, 116, 262-268.
- **BENAMAR M. (2009).** Etude de l'activité antimittotique et anticancéreuse des alcaloïdes naturels ou synthétiques d'*Arisarum vulgare* targ. et de *Pancratium foetidum* pom. sur deux lignées cellulaires cancéreuses p815 et hep. Université Mohammed Premier. Faculté des sciences : OUJDA. Thèse.
- **BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. and TROGOLO C. (1981).** *Phytochemistry*, 20, 465-468.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **BLACK B E. and BASSETT E A. (2008).** The histone variant CENP-A and centromere specification. *Current Opinion in Cell Biology*, 20, 91-100.
- **BOGA M., ERTAS A., YILMAZ MA., MURAT K. , ÇEKEN B., HASIMI N., YILMAZ OZDEN T., DEMIRCI S., YENER I. and DEVECI O. (2016).** UHPLC-ESI-MS/MS and GC-MS Analyses on Phenolic, Fatty Acid and Essential Oil of *Verbascum pinetorum* with Antioxidant , Anticholinestrase, Antimicrobial and DNA Damage Protection Effects. *Iran J Pharm Res*, 15(3), 393-405.
- **BOUKEF M K. (1986).** Médecine Traditionnelle et pharmacopée Les plantes de la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, France, 82-83.
- **BOUMENDJEL A., PIETRO A D., DUMONTET C. and BARRON D. (2002).** Recent Advances in the Discovery of Flavonoïds and Analogs with High-Affinity Binding to P-Glycoprotein Responsible for Cancer Cell Multidrug Resistance. *Medicinal Research Reviews*, 22, 512-529.
- **BRUNETON. (1999).** Pharmacognosie-plantes médicinales et phytochimie. Tec et Doc, ed., Paris.
- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition Tec & Doc. Paris, 1268p.
- **CAMPAROTO M L., TEIXEIRA R O., MANTOVANI M S. and VICENTINI V E P. (2002).** Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genet. Mol. Biol*, 25, 85-89.
- **CALIS I., GROSS G A., WINKLER T. and STICHER O. (1988).** *Planta Medica*, 54, 168-170.
- **CAROLE R. (2011).** Etude de la toxicité cardiaque des médicaments anticancéreux. Université de Bourgogne, France. Thèse.
- **CASAGRANDE F.and DARBON J M. (2001).** Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1205-1215.
- **CARMICHEAL J., DEGRAFF WG. GAZDAR AF., MINNA JD. and MITCHELL JB. (1987).** Evaluation of a tetrazolium based semi automated colorimetric assay : Assesment of chemosen sitivity testing. *Cancer Res*, 49, 936-942.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **CHAUHAN L K S., SAXENA P N. and 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.
- **CHEESEMAN I M. and DESAI A. (2008).** Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, (9), 33-46.
- **COLOMBEL V. (2009).** Synthèse et étude de l'activité biologique de nouveaux analogues du *N*-acétylcolchicol. Université Claude Bernard Lyon 1, France. Thèse.
- **D'AMATO F. (1954).** Action des facteurs physiques et chimiques sur la mitose. *Int. Botanique*, 9, 1-9. *In* DEYSSON G., (1956).
- **DABYDEEN D., FLORENCE G., PATERSON I. and HAMEL E. (2004).** *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53, 397-403.
- **DENIZOT F. and LANG R. (1986).** Rapid calorimetric assay for cell growth and survival : Modification to tetrazolium aye procedure giving improved sensitivity and reliability *J. Immunol Methods*, 89, 271.
- **DEYSSON G. (1956).** Les facteurs de la mito-inhibition végétale. VI. p. 241-274. *In* ANDRÉ THOMAS J., (1956).
- **DIALLO B. et DIOUF A. (2000).** Etude de l'activité analgésique du *Pilostigma reticulatum* (Nguiguiguis). *Odonto-Stomatologie Tropicale*. N°92.
- **DIMITROVA P., KOSTADINOVA E., MILANOVA V., ALIPIEVA K., GEORAGIEV M. and IVANOVSKA N. (2012).** Anti-inflammatory properties of extracts and compounds isolated from *Verbascum xanthopoeniceum* Griseb. *Phytother Res*, 26(11), 1681-7.
- **DRISSI A., BENNANI H., GITON F., CHARROUF Z., FIET J. and ADLOUNI A. (2006).** Tocopherols and Saponins Derived From *Argania spinosa* Exert,an Antiproliferative effect on Human Prostate Cancer. *Cancer Investig*, 24,588-592.
- **EISENBRAND G., POOL-ZOBEL B., BAKER V., BALLS M., BLAUERBOER A., BOOBIS A., CARER A., KEVEKORDES S., LHUGENOT JC., PIETERS R and KLEINER J.(2002).** Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical toxicology*.40, 193-236.
- **EL-GHAMERY A A., EL-NAHAS A I. and MANSOUR M M. (2000).** The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and

- nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65 (3) ,277-287.
- **FASLA B. (2009)**. Evaluation du potentiel antimitotique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Université d'Oran Es-Sénia. Faculté des sciences. Département de biologie. Algérie. Thèse.
 - **FORMICA J V. and REGELSON W. (1995)**. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoïds. *Food & Chemical Toxicology* 33, 1061-1080.
 - **FUSCONI A., REPETTO O., BONA E., MASSA N., GALLO C., DUMAS-GAUDOT E. and BERTA G. (2006)**. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum L.* CV. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 253–260.
 - **GABARA B., KALWINEK J., KOZIRO A., ŻAKOWSKA Z. and BRYCKI B.(2006)**. Influence of N, N Bis (3- Aminopropylo) Dodecyloamine on the ultrastructure of nuclei in *Aspergillus niger* mycellium and on cell proliferation and mitotic disturbances in *Allium cepa L.* root meristem. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48 (1),45-52.
 - **GARRETT R H. and GRISHAM C M. (2000)**. Biochimie. De boeck université édition, p. 1950-1962.
 - **GRIGORE A., COLCERU-MIHUL S., LITESCU S., PANTELI M. and RASIT I. (2013)**. Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullien). *Pharm Biol*, 51(7), 925-929.
 - **GUERITTE et FAHY, (2005)**. The vinca-alkaloids. In CRAGG G M., KINGSTON D G I., NEWMAN D J. (2005).
 - **HAIT W N., RUBIN E., ALLI E. and GOODINA S. (2006)**. Tubulin Targeting Agents. Update on Cancer Therapeutics. *Uct*, 37(18).
 - **HARBORNE J B. and WILLIAMS C A. (2000)**. Advances in flavonoïd research since 1992. *Phytochemistry*,55, 481-504.
 - **HEIM K E., TAGLIAFERRO A R. and BOBILYA D J. (2002)**. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.
 - **HOSHINA M M. (2002)**. Evaluation of a Possible Contamination of the Waters of the Claro River-Municipality of Rio Claro, Part of the Corumbataí River Basin, with

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- the Mutagenicity Tests Using *Allium Cepa*. 52f. Monograph (Bachelor's and Teaching degrees) – State University of São Paulo, Rio Claro, SP (in Portuguese).
- **HOSSEINPOUR M., MOBINI-DEHKORDI M., SAFFAR S and TEIMORI H. (2013).** Effets anti-prolifération de *Matricaria chamomilla* sur *Saccharomyces cerevisiae*. *HerbMed Pharmacol*, 2 (2), 49-51.
 - **HÔLZEL J (1997).** *The genus Valerian*. In: HOUGHTON P J, Ed. Valerian, Harwood Academic Publishing, Amsterdam.
 - **IHOUAL S., KARAAMI W. and ABIDLI N. (2017).**Antioxydant, Anti-Prolifératif, et Induction de l'Apoptose par l'Extrait Méthanolique de *Phlomis samia* d'Algérie. *Der Pharma Chemica*,9(7),99-107.
 - **JANIN M Y L. (1993).** Analogues et dérivés inédits des benzo [c]phénanthridines antitumorales .Synthèse et étude biologique. Université PARIS 6.
 - **JEAUN J. M., ANNIEF. et CHRYSTIAN J L. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.
 - **KARP G. (1998).** Biologie cellulaire et concepts et expériences. De Boeck université, ed , Bruxelles, p.665
 - **KHITRI W., ZENAKI J., ABI A., LACHGEUR N. and LARDJEM A.(2014).** Evaluation of Wound Healing Activity of *Phlomis bovei De Noe*: In WISTAR ALBINO Rats. *International journal of pharmacological and pharmaceutical Sciences*, 1(11).
 - **KONUK M., LIMAN R. and CIGERCI H. (2007).** Détermination de l'effet génotoxique du bore sur les cellules méristématiques de racine de *Allium cepa*. *Pak. J. Bot.*, 39(1),73-79
 - **KOZAN E.,ÇANKAYA IT.,KAHRAMAN C., AKKOL EK. and AKDEMIR Z. (2011).**The *in vivo* anthelmintic efficacité of some *Verbascum species* growing in Turkey. *Exp Parasitol*,129(2),211-214.
 - **KRIEF S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.
 - **KWAN Y P., DARAH I., UMI K. Y., CHEN Y. and SREENIVASAN S. (2012).** Génotoxicité de *Euphorbia hirta* : An *Allium cepa* Assay. *Molecules*, 17, 7782-7791.
 - **LIOLIOS C., LAOUER H., BOULAACHEB N., GORTZI O. and CHINOUI I. (2015).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Phlomis bovei De Noé subsp. Bovie*. *Molecules*,12(4),772-781.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **LAMBERT N., TROUSLOLOT M F., NEF-CAMPA C., and CHRESTIN H. (1993).** Production of rotenoids by hetrotrophic and photomixotrophic cell cultures of *Tephrosia vogelii*. *Phytochemistry*, 34, 1515-1520.
- **LIMEM-BEN AMOR I., BOUBAKER J., BEN SGAIER M., SKANDRANI I., BHOURI W., NEFFATI A., KILANI S., INES BOUHLEL., GHEDIRA K. and CHEKIR GHEDIRA L. (2009).** Phytochemistry and biological activities of *Phlomis species*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 183-202.
- **Li M-X., SHANG X-F., JIA Z-P. and ZHANGA R-X. (2010).** Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Phlomis*. *Chemistry & Biodiversity*, 7 (2), 283-301.
- **LEVAN A. (1938).** The effect of colchicine on root mitoses in *Allium hereditas*. (24), 471- 486.
- **LUCH A. (2002).** Cell Cycle Control and Cell Division: Implications for Chemically Induced Carcinogenesi. *ChemBioChem*, 3,506-516.
- **MAILLET M. (2002).** Biologie cellulaire. Masson, éd., Paris. p.257-274.
- **MARCANO L., CARRUYO I., FERNANDEZ Y., MONTIEL X. and TORREABLA Z. (2006).** Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa*) and its correlation with toxicity. *Biocell.*, 30, 259-267.
- **MOIEN S., MOIEN M., KHOSHNOUD MJ. and KALANTERI T. (2012).** *In Vitro* Antioxidant Properties Evaluation of 10 Iranian Medicinal Plants by Different Methods. *Iran Red Crescent Med J*, 14(12), 771-775.
- **MARCHEV A.,YORDANOVA Z., ALIPIEVA K., ZAHMANOV G., RUSINOVA-VIDEVA S., KAPCHINA-TOTEVA V., SIMOVA S., POPOVA M. and GEORGIEV MI.(2016).** Genetic transformation of rare *Verbascum eriophorum* Goder. Plants and metabolic alterationserved by NMR-based metabolomics. *Biotechnol Lett*, 38(9), 1621-1629.
- **MARY H. (2015).** Analyse et Modélisation de la Dynamique des Chromosomes durant la Mitose chez la Levure à Fission. Université de Toulouse, France. Thèse.
- **MATA J. et NURSE P. (1997).** Tea1 and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell* 89, 939-949.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **MCEWEN B.F., DONG Y. and VANDENBELDT K J. (2007).** Using electron microscopy to understand functional mechanisms of chromosome alignment on the mitotic spindle. *Methods in Cell Biology* 79, 259-293.
- **MERCYKETLY V.C and STEPHEN J. (1980).** Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by *Allium cepa* test. *Cytologia*, 45,769-777.
- **MINTON N A. and ADAMSON W C. (1979).** Response of *Tephrosia vogelii* to four species of root-knot nematodes. *Plant Dis. Repr.* 63,514.
- **MOHAMMEDI Z. (2013).** Etude phytochimique et activités biologique de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat : Biologie. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen.
- **MOSMANN T. (1983).** Rapid colorimetric assays growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. ImmunoLmethods*, 65(1),55-63.
- **MÜLLER W U. and STREFFER C. (1994).** Micronucleus assays. *Adv. Mutagen. Res.* 5 (1),129- 134.
- **OZENDA P. (1991).** Flore du Sahara, Ed.CNRS Paris France.
- **PANDA B B., and SAHU U K. (1985).** Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fenitrothion. *Cytobios*, 42,147-155.
- **POLETTI A. (1988).** Fleurs et plantes médicinales, 2ème ed.Delachaux & Niestlé, Neuchâtel Suisse.
- **QUEZEL P. et SANTA S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed.), Paris, p 812.
- **RANK J. and NIELSEN M H (1997).** *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen:* 390, 121–127.
- **RIAZ M., ZIA-UL-HAQ M. and JAAFA H Z E. (2013).** Common mullein, pharmacological and chemical aspects Author links open overlay panel, V23,Issue 6, 948-959.
- **SACKETT D. (1993).** Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: Natural products that bind at the colchicine site of tubulin. *Pharmac. Ther.* 59, 163-228.
- **SARIKURKCU C., SABIH OZER M., CAKIR A., ESKICI M. and MET E. (2013).** GC/MS Evaluation and *in Vitro* Antioxidant Activity of Essential Oil and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

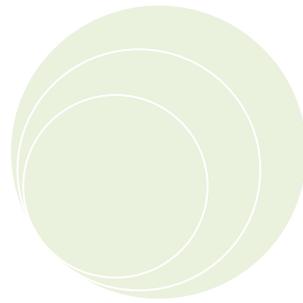
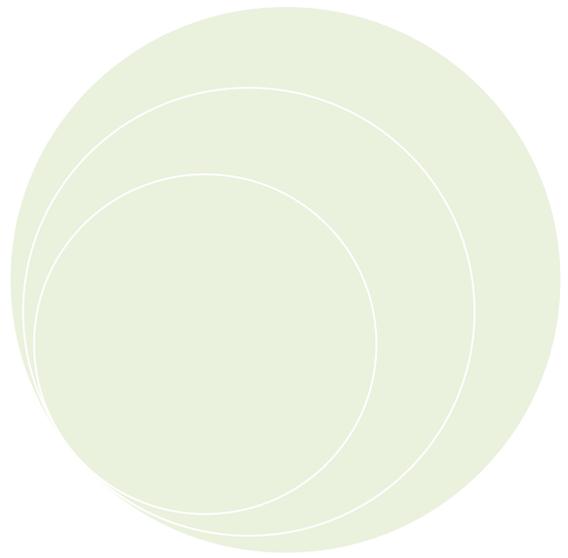
- Solvent Extracts of an Endemic Plant Used as Folk Remedy in Turkey: *Phlomis bourgaei* Boiss. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013, Article ID 293080, p7.
- **SCHULZE E. and KIRSCHER S. (1996).** Microtubule dynamics in interphase. Cellular Journal of Cell Biology, 102, 1020-1031.
 - **SCHWOB E. (2001).** Bull Cancer, 88(10) ,937.
 - **SHARMA C B. (1983).** Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. Curr. Sci, 52, 1000-1002.
 - **SENATORE F., RIGANO D., FORMISANO C., GRASSIA A., BASILE A., and SORBOS. (2007).** Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. Fitoterapia, 78(3), 244-247.
 - **SENER A. and DULGER B.(2009).** Antimicrobial activity of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. on microorganisms isolated from urinary tract infection. African Journal of Microbiology Research, 3(11), 778-781.
 - **SIDDIQUI S., MEGHVANSI M K. and HASAN Z. (2007).** Cytogenetic changes induced by sodium azide (NaN₃) on *Trigonella foenum-graecum* L. seeds. South African Journal of Botany, 73,632-635.
 - **SRIVASTAVA JK., and GUPTA S(2009).** Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. Mole Cell Pharmacol,1(3),138.
 - **SOTOODECH A. (2016).**Histoire biogéographique et évolutive des genres *Verbascum* et *Artemisia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire .
 - **STALIKAS C D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoïds. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.
 - **STICHER O. (1977).** *Plant mono-, di- and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutical activity*. In: WAGNER H., WOLFF P. Ed. New Natural Products and Plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity. Springer-Verlag, New York, Berlin.
 - **STOCLET J C. et SCHINI-KERTH V. (2011).** Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. Annales Pharmaceutiques Françaises, 69, 78-90.
 - **TÜRKOĞLU S. (2008).** Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

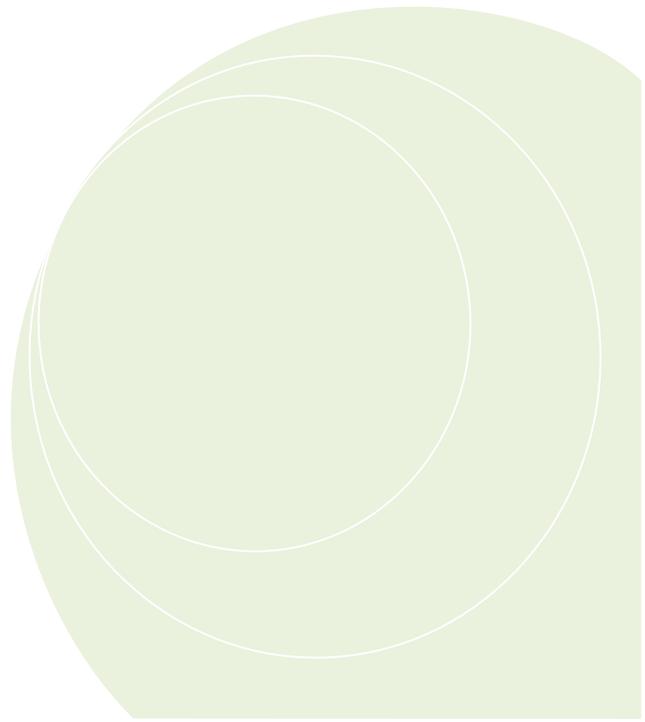
- cepa* L. Food and Chemical Toxicology, xxx (2008) xxx–xxx (Online Science Direct).
- **URQUIAGA I. and LEIGHTON F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33 (2), 55-64.
 - **VERDIER-PINARD P., LANSIAUX A. et BAILLY C. (2001).** Combretastatin A4 phosphate. *Bulletin du Cancer*, 88 (3),235-239.
 - **VERHOEYEN M E., BOVY A., COLLINS G., MUIR S., ROBINSON S., DE VOS C H R. and COLLIVER S. (2002).** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoïd biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*, 53(377), 209 -210.
 - **WADA B. (1939).** Experimentelle Untersuchungen lebender Zelle in der Teilung. HHH. Die Einwirkung des chlorophorm und Atherdampfes auf die Mitose bei den Tradescantia Haarzellen. *Cytologia*, 9,460-479. In DEYSSON G. (1956).
 - **WALCZAK C E., MITCHISON T J., and DESAI A. (2010).** XKCM1: A Xenopus Kinesin Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly. *Cell* 84, 37- 47.
 - **WANI M C.; TAYLOR H L. and WALL M E J. (1971).** Plant antitumour agents. VI. The isolation of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Am. Chem. Soc.*, 93, 2325-2327.
 - **WEBSTER P L. and DAVIDSON D. (1969).** Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indoleylacetic acid in *Vicia faba* roots. *Journal of Experimental Botany*, 20: 671-685.
 - **YAHIAOUI M., HADOUN H., TOUMERT I and HASSANI A. (2005).** Determination of kinetic parameters of *Phlomis bovei de Néo* using thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, 169, 441-447.
 - **YALÇINA FN., ERSÖZA T., BEDIRB E., DÖNMEZC AA., STAVRID M., ZLOHE M., GIBBONS S. and CALIS I. (2006).** Amanicadol, a Pimarane-type Diterpene from *Phlomis amanica Vierch.* *A Journal of Chemical Science*, Volume 61 issu 11, 1433-1436.
 - **ZHAO YL., WANG SF., LI Y., HE QX., LIU KC., YANG YP. and LI XL. (2011).** Isolation of chemical constituents from the aerial parts of *Verbascum Thapsus* and their antiangiogenic and antiproliferative activities. *Archives of Pharmacal Resrarch*.34, 703.707.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ZOGGRAFIDIS A. (2016).** Two new infraaspecific taxa of *Verbascum delphicum* (*Scrophulariaaceae*, *Scrophularieae*) from mainland Greece and the island of Evvia. *PhytoKeys*, (74), 107- 122.
- Guide illustré de la flore Algérienne. [En ligne]. <http://www.wilaya.alger.dz/guide%20illustr%C3%A9%20de%20la%20flore%20alg%C3%A9rienne%20.pdf>. Consulté le 02.07.2018
- Structure chimique des tanins disponible sur : <https://fr.m.wikipedia.org/wiki/tanin>. Consulté le 22.08.2018.
- *Verbascum sinuatum*- Tela Botanica. [En ligne]. <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-70972-synthese>. Consulté le 15.07.2018
- Molène-Fleurs du Roussillon. [En ligne]. <http://jeantosti.com/Fleur/molene.htm.pdf>. 15.07.2018.



ANNEXE



Annexe 01 : Composition de milieu de culture de *S. cerevisiae*.

Le milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae* est préparé à partir des éléments séparés suivant :

• Bactopeptone	10g
• Glucose	25g
• Eau distillée stérile	700ml
• Tampon phosphate ph 3.8	300ml
• Na ₂ HPO ₄	26.88g
• Acide citrique	17.6g

Annexe 2 : Dénombrement des cellules de levure

Pour dénombrer les cellules de levure contenue dans la suspension, on place une lamelle de verre sur la cellule de Malassez, sur laquelle on dépose 10 µl de suspension de levure. Après sédimentation des cellules, nous procédons à l'observation sous microscopique optique (X400).

Le comptage a été effectué dans 10 rectangles de la cellule de Malassez. Le nombre de cellules retrouvé est de 942 cellules, sachant que la cellule de Malassez a 100 rectangles, on obtient :

Moyenne des cellules comptées = $942 / 10 = 94.2$ Cellules/ rectangle

Nombre des cellules totale = $100 \times 94.2 / 1 = 9420$ cellules/µl

Nombre des cellules totale par mL = $9420 \times 10^3 = 9.42 \times 10^6$ Cellules/ ml = 10^7 cellules/ml

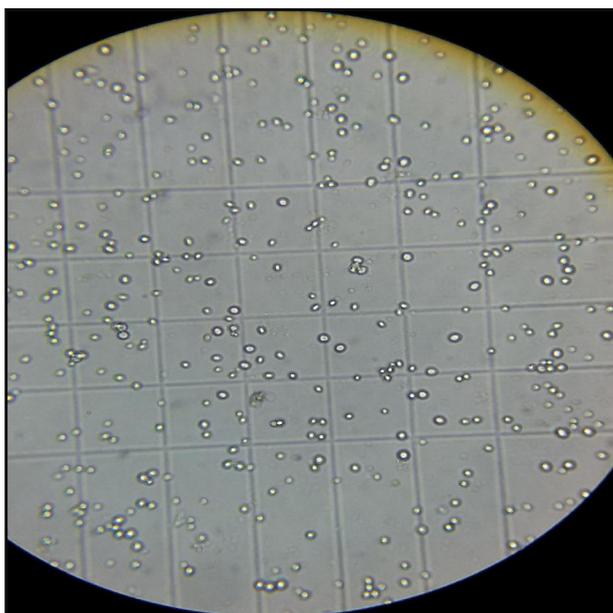


Figure : Cellule Malassez sous microscope optique (X 400).

Annexe 3 : Résultats de la Densité optique

Témoins	Blanc	D.O	Différence
Culture	0,031	1,013	0,982
Quercétine	0,747	1,591	0,844
<i>Phlomis Bovei</i>	0,118	1	0,882
<i>Verbascum Sinuatum</i>	0,204	1,278	1,074

Annexe 4 : Test de « ANOVA de Cruskal-Wallis ».

Feuille* (17 var. et 41 obs.)

Classeur2* - Test Médiane, Méd. Globale = 55,0000; im (Feuille)

Classeur2*

- Non-Paramétri
 - Boîte de dia
 - ANOVA
 - Test Mé
 - ANOVA
 - Test Mé

		Test Médiane, Méd. Globale = 55,0000; im (Feuille)			
		Var. indépendante (classement) : con			
		Chi-Deux = 20,00000 dl = 2 p = ,0000			
Dépendant :	im	C1	C2	C3	Total
<= Médiane : observ.		10,00000	5,00000	0,00000	15,00000
	théorique	5,00000	5,00000	5,00000	
	obs.-thé.	5,00000	0,00000	-5,00000	
> Médiane : observée		0,00000	5,00000	10,00000	15,00000
	théorique	5,00000	5,00000	5,00000	
	obs.-thé.	-5,00000	0,00000	5,00000	
Total : observé		10,00000	10,00000	10,00000	30,00000

Annexe 5: Test de «Mann Whitney».

dition Affichage Insertion Format Statistiques Graphiques Outils Données Classeur Fenêtre Aide

Ajouter au Classeur Ajouter au Rapport

10 G I S

Classeur1* - Test U de Mann-Whitney (Feuille)

Classeur1*

- Non-Paramétri
 - Boîte de dia
 - Test U d

		Test U de Mann-Whitney (Feuille)								
		Par var. témoin								
		Tests significatifs marqués à p <,05000								
variable	SommeRgs T-	SommeRgs T+	U	Z	niv. p	Z ajusté	niv. p	N Actif T-	N Actif T+	2*(1-p) p exact
IM	40,00000	15,00000	0,00	2,611165	0,009024	2,611165	0,009024	5	5	0,007937

Annexe 6 : Comparaison des dilutions de *Phlomis bovei* au témoin positif par le test de
« Comparer une moyenne à un standard ».

Classeur3* - Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)

Classeur3*

Statistiques Elé

Test de con

Compar

Variable	Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)							
	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
C1PH	43,78800	4,964541	5	2,220210	37,31000	2,91774	4	0,043341
C2PH	50,51200	8,953104	5	4,003950	37,31000	3,29724	4	0,030011
C3PH	68,28400	3,126257	5	1,398104	37,31000	22,15428	4	0,000025

Annexe 7 : Comparaison des dilutions de *Phlomis bovei* au témoin négatif par le test de
« Comparer une moyenne à un standard ».

Classeur1* - Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)

Classeur1*

Statistiques Elé

Test de con

Compar

Variable	Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)							
	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
C1PH	43,78800	4,964541	5	2,220210	82,72000	-17,5353	4	0,000062
C2PH	50,51200	8,953104	5	4,003950	82,72000	-8,0441	4	0,001297
C3PH	68,28400	3,126257	5	1,398104	82,72000	-10,3254	4	0,000496

Annexe8 : Comparaison des dilutions de *Verbascum sinuatum* au témoin négatif par le test de « Comparer une moyenne à un standard ».

Classeur2* - Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)

Classeur2*

Statistiques Elé

Test de con

Compar

Compar

Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)								
Variable	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
C1V	42,29600	3,454697	5	1,544987	82,72000	-26,1646	4	0,000013
C2V	56,97000	4,359742	5	1,949736	82,72000	-13,2069	4	0,000190
C3V	68,27400	2,737440	5	1,224221	82,72000	-11,8002	4	0,000295

Annexe9 : Comparaison des dilutions de *Verbascum sinuatum* au témoin positif par le test de « Comparer une moyenne à un standard ».

Classeur2* - Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)

Classeur2*

Statistiques Elé

Test de con

Compar

Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille)								
Variable	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
C1V	42,29600	3,454697	5	1,544987	37,31000	3,22721	4	0,032060
C2V	56,97000	4,359742	5	1,949736	37,31000	10,08342	4	0,000544
C3V	68,27400	2,737440	5	1,224221	37,31000	25,29283	4	0,000015

Résumé

Les plantes médicinales sont une source de molécules bioactives qui génèrent des activités biologiques. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à deux plantes du bassin méditerranéen : *Phlomis bovei de Néo* et *Verbascum sinuatum*.

La mise en évidence de l'effet antimittotique des extraits aqueux foliaires des deux plantes a été évaluée par le test d'*Allium cepa*, où des indices mitotiques ont été calculés. Des anomalies cellulaires, nucléaires et chromosomiques ont été observées. Par ailleurs, l'effet cytotoxique de nos extraits aqueux sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* a été apprécié par le test antiprolifératif-MTT où le taux de viabilité cellulaire a été estimé.

Nos résultats ont révélés un effet antimittotique générant des agglutinations chromosomiques, des allongements cellulaires ainsi que des fragmentations chromosomiques. Par contre l'étude de l'activité antiproliférative a montrée un effet modéré pour l'extrait aqueux de *Phlomis bovei de Néo* sur la prolifération des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* avec un pourcentage de mortalité de 10,19%. Par contre l'extrait de *Verbascum sinuatum* n'a présenté aucun effet antiprolifératif.

Mots clés : Extrait aqueux foliaire, *Phlomis bovei de Néo*, *Verbascum sinuatum*, activité antimittotique, activité antiproliférative.

Abstract

Medicinal plants are a source of bioactive molecules that generate biological activities. It is in this perspective that we are interested in two plants of the mediterranean basin: *Phlomis bovei of Neo* and *Verbascum sinuatum*.

Demonstration of the antimitotic effect of the aqueous leaf extracts of both plants was evaluated by the *Allium cepa* test, where mitotic indices were calculated. Cellular, nuclear and chromosomal abnormalities have been observed. Furthermore, the cytotoxic effect of our aqueous extracts on *Saccharomyces cerevisiae* cells was assessed by the antiproliferatif-MTT test where the cell viability rate was estimated.

Our results revealed an antimitotic effect generating chromosomal agglutination, cell elongation and chromosomal fragmentation. In contrast, the study of antiproliferatif activity showed a moderate effect for the aqueous extract *Phlomis bovei of Neo* on the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* cells with a mortality percentage of 10.19%. In contrast, *Verbascum sinuatum* extract showed no antiproliferatif effect.

Key words: Leaf aqueous extract, *Phlomis bovei*, *Verbascum sinuatum*, antimitotic activity, antiproliferatif activity.

ملخص

النباتات الطبية هي مصدر للجزيئات النشطة بيولوجيا و التي تولد الأنشطة البيولوجية. ومن هذا المنظور اهتمامنا بنبتتين من حوض البحر الأبيض المتوسط *Verbascum sinuatum* و *Phlomis bovei*.

تم تقييم عرض التأثير المضاد للانقسام الخلوي لمستخلصات نبات مائي من كلا النبتتين بواسطة اختبار *Allium cepa* ، حيث تم حساب مؤشرات الانقسامية. وقد لوحظ خلل خلوي، نووي و كروموزومي. و من جهة أخرى، تم تقدير تأثير المركبات السامة للخلايا من المستخلص المائي على خلايا خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* بواسطة الفحص MTT أين تم تقدير نسبة بقاء الخلايا.

وكشفت نتائجنا عن تأثير مضاد للانقسام الخلوي يولد تراص كروموزومي ، واستطالة الخلايا وتجزئة الكروموزومات. أما دراسة النشاط المضاد للتكاثر قد أظهرت تأثير معتدل للمستخلص المائي لـ *Phlomis bovei* على انتشار خلايا خميرة الخبز مع نسبة وفاة الخلايا 10.19٪، في المقابل لم يظهر *Verbascum sinuatum* أي تأثير مضاد للتكاثر.

الكلمات المفتاحية: مستخلص أوراق مائي، *Phlomis bovei*، *Verbascum sinuatum*، نشاط مضاد للانقسام الخلوي، نشاط مضاد للتكاثر.

Résumé

Les plantes médicinales sont une source de molécules bioactives qui génèrent des activités biologiques. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à deux plantes du bassin méditerranéen : *Phlomis bovei de Néo* et *Verbascum sinuatum*.

La mise en évidence de l'effet antimittotique des extraits aqueux foliaires des deux plantes a été évaluée par le test d'*Allium cepa*, où des indices mitotiques ont été calculés. Des anomalies cellulaires, nucléaires et chromosomiques ont été observées. Par ailleurs, l'effet cytotoxique de nos extraits aqueux sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* a été apprécié par le test antiprolifératif-MTT où le taux de viabilité cellulaire a été estimé.

Nos résultats ont révélés un effet antimittotique générant des agglutinations chromosomiques, des allongements cellulaires ainsi que des fragmentations chromosomiques. Par contre l'étude de l'activité antiproliférative a montrée un effet modéré pour l'extrait aqueux de *Phlomis bovei de Néo* sur la prolifération des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* avec un pourcentage de mortalité de 10,19%. Par contre l'extrait de *Verbascum sinuatum* n'a présenté aucun effet antiprolifératif.

Mots clés : Extrait aqueux foliaire, *Phlomis bovei de Néo*, *Verbascum sinuatum*, activité antimittotique, activité antiproliférative.

Abstract

Medicinal plants are a source of bioactive molecules that generate biological activities. It is in this perspective that we are interested in two plants of the mediterranean basin: *Phlomis bovei of Neo* and *Verbascum sinuatum*.

Demonstration of the antimittotic effect of the aqueous leaf extracts of both plants was evaluated by the *Allium cepa* test, where mitotic indices were calculated. Cellular, nuclear and chromosomal abnormalities have been observed. Furthermore, the cytotoxic effect of our aqueous extracts on *Saccharomyces cerevisiae* cells was assessed by the antiproliferatif-MTT test where the cell viability rate was estimated.

Our results revealed an antimittotic effect generating chromosomal agglutination, cell elongation and chromosomal fragmentation. In contrast, the study of antiproliferatif activity showed a moderate effect for the aqueous extract of Neo *Phlomis bovei* on the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* cells with a mortality percentage of 10.19%. In contrast, *Verbascum sinuatum* extract showed no antiproliferatif effect.

Key words: Leaf aqueous extract, *Phlomis bovei*, *Verbascum sinuatum*, antimittotic activity, antiproliferatif activity.