

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE- MICROBIOLOGIE



Mémoire de Fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme
De MASTER
En Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

**Evaluation *in vitro* de l'effet antimittotique de l'extrait méthanolique des feuilles
de *Peganum harmala L.* de la région de Laghouat (Algérie)**

Réalisé par :
ZEGHOUNI ASSIA

Membres du jury :

Présidente : Mme SMAÏL-SAADOUN N.	Professeur à UMMTO.
Promotrice: Mme NAÏT KACI BOUDIAF M.	Maitre de conférences classe A à UMMTO.
Co-promotrice : Mme OUZID Y.	Docteur à UMMTO.
Examinatrice : Mme AICHE-IRATNI G.	Maitre de conférences classe B à UMMTO.

Promotion 2018/2019

RESUME

Les plantes médicinales sont une source inépuisable de molécules bioactives à l'origine de plusieurs activités biologiques. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'évaluation *in vitro* de l'activité antimittotique (Test *Allium cepa*) de l'extrait méthanolique des feuilles de *Peganum harmala*, une plante spontanée des zones arides d'Algérie (Laghouat). Différentes concentrations (16 ; 10 ; 4 ; 1mg/ml) ainsi que les deux standards à la concentration 1mg/ml : la colchicine et la quercétine ont été testés. Des indices mitotiques (IM%); des valeurs limites de cytotoxicité (VLC%) et des indices de phases (IP%) ont été calculés, et différentes aberrations ont été recensées chez les cellules méristématiques d'oignon traitées par les différentes concentrations ainsi que les deux standards. Nos résultats révèlent que l'extrait méthanolique des feuilles de *P.harmala* inhibe la mitose, avec un effet comparable à celui des deux standards. L'augmentation des concentrations en extrait s'accompagne par une diminution des différents indices calculés. Des moyennes d'IM(%) de $35,93 \pm 0,62\%$ et de $1,25 \pm 0,20\%$, ainsi que des VLC(%) de $1,21 \pm 0,25(\%)$ et $40,95 \pm 0,70(\%)$ ont été obtenues pour les concentrations 1 et 16 mg/ml respectivement. Nos extraits bloquent la mitose en prophase qui est majoritairement présente, et causent une augmentation d'indices d'anomalies (IA%), représenté par des taux dominants d'agglutinations, de fragmentations chromosomiques et des cellules binucléés, des cellules gigantesques et la désorganisation de la plaque équatoriale. L'analyse statistique type ANOVA et le test de Newman Keuls confirme un effet antimittotique des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala* à différentes concentrations, similaire aux deux standards (Colchicine et Quercétine).

Mots clés : *Peganum harmala* ; activité antimittotique; extrait méthanolique foliaire, molécules bioactives, Laghouat.

ABSTRACT

Medicinal plants are an inexhaustible source of bioactive molecules at the origin of several biological activities. It is with this in mind that we are interested in the in vitro evaluation of the antimitotic activity (*Allium cepa* test) of the methanolic extract of the leaves of *Peganum harmala*, a spontaneous plant in the arid zones of Algeria (Laghouat). Different concentrations (16, 10, 4, 1 mg / ml) as well as the two standards at 1 mg / ml concentration: colchicine and quercetin were tested. Mitotic indices (MI%); cytotoxicity limit values (VLC%) and phase indices (IP%) were calculated, and different aberrations were recorded in meristematic onion cells treated with different concentrations and both standards. Our results reveal that the methanolic extract of *P.harmala* leaves inhibits mitosis, with an effect comparable to that of both standards. The increase in extract concentrations is accompanied by a decrease in the various indices calculated. MI (%) averages of $35.93 \pm 0.62\%$ and $1.25 \pm 0.20\%$, as well as VLC (%) of $1.21 \pm 0.25 (\%)$ and $40.95 \pm 0.70 (\%)$ were obtained for concentrations 1 and 16 mg / ml respectively. Our extracts block the predominantly present prophase mitosis, and cause an increase in indices of abnormalities (IA%), represented by dominant rates of agglutination, chromosomal fragmentation and binucleate cells, gigantic cells and disorganization. of the equatorial plate. The ANOVA statistical analysis and the Newman Keuls test confirm an antimitotic effect of methanolic extracts of *Peganum harmala* leaves at different concentrations, similar to both standards (Colchicine and Quercetine).

Key words: *Peganum harmala*; antimitotic activity; foliar methanolic extract, bioactive molecules, Laghouat.

ملخص

النباتات الطبية هي مصدر لا ينضب من الجزيئات النشطة بيولوجيا، فإصلاح العديد من الأنشطة البيولوجية. من هذا المنطلق، نحن مهتمون بتقييم المختبر للنشاط المضاد للسرطان للمستخلصات الميثانولية لأوراق اقنبان للحرمل من خلال إختباره على الخلايا المرستيمية للبصل. الحرمل هو نبات عفوف في المناطق القاحلة في الجزائر (الأغواط). تماختبار تركيزا مختلفة (16، 10، 4، 1 ملغ / مل) وكذلك المعيار ينتركيز 1 ملغ / مل: كولشيسينو كيرستينين. مؤشر انالانزيم؛ تمحساب قيم حد السمية الخلوية (VLC) % ومؤشر اتالطور (IP) %، وسجلت انحرافات مختلفة في خلايا البصل لمارستيماتية التي عولجت بتركيزا مختلفة وكلا المقاييس. تكشفنا انجنا أن مستخلصات الميثانولية لمناوراق الحرمل يمنع الانقسام الخلوي، مع تأثير مماثل لتأثير كل من المعايير. ويصاحب الزيادة في تركيزا استخراجا انخفاض في مختلف المؤشرات المحسوبة. متوسط (MI) يبلغ $35.93 \pm 0.62\%$ و $1.25 \pm 0.20\%$ ، وكذلك VLC % (1.21 ± 0.25) و 40.95 وتم الحصول على 0.70 % للتركيزات 1 و 16 ملغ / مل لعنا التوالي. مقتطفات لدنيا تسد الانقسامات طور الحالفيا الغالب، وتنسب فيز زيادة في مؤشرات IA %، ممثلة في معدل المهيمنة من تراص، تجزئة الكروموسوماتو الخلايا اثنائية النواةو الخلايا العملاقةو عدما لتنظيم داخل اللوحة الاستوائية. يؤكد التحليل الإحصائي ANOVA واختبار Newman Keuls وجود تأثير مضاد للسرطان لمستخلصات الميثانولية لمناوراق الحرمل عند مختلف تركيزا مختلفة، علغرار كل من المعايير (كولشيسينو كيرستينين).

كلمات مفتاحية: الحرمل؛ نشاط مضاد للسرطان؛ مستخلصات الميثانولية؛ جزيئات نشطة حيويًا، الأغواط.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos plus respectueux remerciement à:

- Madame N'AIT KACI Malika, enseignante à la faculté de sciences biologies de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, notre promotrice .Pour ses encouragement, son soutien et pour avoir accepté de nous encadrer.
- Madame OUZID Yasmina, notre Co-Promotrice, pour son orientation, ses conseils, nous la remercions pour sa disponibilité et ses encouragements continuels. Nous tenons à lui présenter l'expression de notre profond respect.
- Madame AICHE-IRATNI Ghenima, enseignante à la faculté de Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, pour avoir accepté d'examiner ce travail.
- Madame SMAIL SAADOUN Noria, Professeur à la faculté des sciences biologiques de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'elle nous fait de présenter le jury et aussi pour sa disponibilité.

DEDICACES

Je dédié ce travail à

À Mes Chers Parents, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mon marie YOUCEF ainsi que toute sa famille

A mon adorable fille ASMA

A mes Chères sœurs, AMEL, OURIDA, IMENE

A mon Chère frère Mohamed

Et à tous ceux qui contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci

ZEGHOUINI ASSIA

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les métabolites secondaires d'origine végétale	03
1.1. Définition	03
1.2. Les différentes classes de métabolites secondaires	03
1.2.1. Les composés phénoliques	03
1.2.2. Les terpènes	04
1.2.3. Les alcaloïdes	05
II. Généralités sur la plante médicinale : <i>Peganum harmala</i> L.	06
2.1. Aperçu sur <i>Peganum harmala</i> L.	06
2.2. Classification botanique	06
2.3. Description botanique	06
2.4. Phytochimie et propriétés pharmacologiques de <i>Peganum harmala</i> L.	07
2.5. Les activités biologiques des principaux métabolites secondaires de Harmel	09
2.6. Utilisation de <i>Peganum harmala</i> L. en médecine traditionnelle	09
II. Le cycle cellulaire	10
3.1. Définition	10
3.1.1. L'interphase	10
3.1.1.1. La phase G1	11
3.1.1.2. La phase S	11
3.1.1.3. La phase G2	11
3.1.2. La mitose (M)	11
3.1.2.1. La caryocinèse	11
3.1.2.1.1. La prophase	11
3.1.2.1.2. La métaphase	12
3.1.2.1.3. L'anaphase	12
3.1.2.1.4. La télophase	13
3.1.2.2. La cytotédiérèse	13
3.2. La régulation et contrôle du cycle cellulaire	14
IV. Les antimitotiques	16
4.1. Définition	16
4.2. Classification et mécanisme d'action	16
4.3. Microtubules et mitose	16
4.4. Les principaux antimitotiques d'origine végétale et leurs mécanismes d'action	18
4.4.1. La colchicine	18

4.4.2. Les vincaloïdes	19
4.4.3. Les podophyllotoxines	19
4.4.4. Le taxol.....	20
4.4.5. La quercetine	20

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes.....	21
1.1. Matériel	21
1.1.1. Matériel biologique	21
1.1.2. Matériel de laboratoire	22
1.1.3. Solvants et réactifs	22
1.2. Méthodes	22
1.2.1. Préparation des extraits méthanolique.....	22
1.2.2. Evaluation in vitro de l'activité antimittotique des extraits méthanoliques des feuilles de Peganum harmala	25
II. Résultats et discussion	28
Conclusion.....	41
Références bibliographiques	42
Annexes	

LISTE D'ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

M : Mitose

G1 : Gap1

G2 : Gap2

S : Synthèse

CDK : Cyclin-dependant - Kinase

ATP : Adénosine triphosphate

MTOC: Centre organisateurs de microtubules

GTP : Guanosine Triphosphate

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Les principales classes de décomposées phénoliques	04
Tableau II: Classification botanique de <i>Peganum harmala</i> L.....	06
Tableau III: Les principaux principes actifs de <i>Peganum harmala</i> L.....	08
Tableau IV: Les principales Kinase-cyclines dépendantes (CDKS) et leur rôles dans la régulation de cycle cellulaire.....	15
Tableau V: Solvants et réactifs utilisés.....	22
Tableau VI: Les indices mitotiques obtenues chez les cellules du le témoin négatif.....	29
Tableau VII: Les moyennes des indices mitotiques et valeurs limites de cytotoxicité obtenues.....	30
Tableau VIII Comparaison multiple des moyennes des indices mitotiques des différents extraits	31
Tableau IX: Comparaison multiple des moyennes des valeurs limites de cytotoxicité des différents extraits	33
Tableau X : Les moyennes des indices de phases comparées au témoin	34
Tableau XI : Les résultats de l'analyse des variances du type ANOVA pour les indices de phases	35
Tableau XII Les pourcentages des indices d'aberration obtenus	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure chimique phénol simple	03
Figure 2: Structure chimique d'isoprène	04
Figure 3: Structure chimique de quelques alcaloïdes.....	05
Figure 4: Les différentes parties de <i>Peganum harmala</i>	07
Figure 5: Evènements observables durant le cycle cellulaire	10
Figure 6: Représentations schématique d'une cellule en prophase	11
Figure 7: Représentation schématique d'une cellule en métaphase	12
Figure 8: Représentation schématique d'une cellule en anaphase	12
Figure 9: Représentation schématique d'une cellule en télophase	13
Figure 10: Représentation schématique d'une cellule durant la cytotèque	14
Figure 11: Contrôle du cycle cellulaire par les kinase-cyclines dépendantes (CDKs)	15
Figure 12 : Principaux sites d'action des antiméitotiques	16
Figure 13: Formation et structure des microtubules.....	17
Figure 14: Les protéines motrices des microtubules.....	18
Figure 15: Structure chimique de la colchicine.....	18
Figure 16: Structure chimique des vincaloides	19
Figure 17: Structure chimique de la podophyllotoxine.....	19
Figure 18: Structure chimique de taxanes	20
Figure 19 : Structure chimique de la quercétine	20
Figure 20: La situation géographique de la zone d'étude.....	21
Figure 21 : Schéma du protocole expérimental de la préparation des extraits méthanoliques des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L	23
Figure 22: Schéma du protocole expérimental de l'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antiméitotique.....	24
Figure 23: Les différentes phases de la mitose rencontrées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> (témoin négatif) (x400).....	28
Figure 24: Image de quelques anomalies observées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> (x400)	36
Figure 25: Histogramme des aberrations observées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> (x400)	38

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules présentant un grand intérêt thérapeutique (GURIB-FAKIM, 2006). Au cours de ces dernières années, l'intérêt pour la phytothérapie a considérablement augmenté. C'est pour cela que la recherche actuelle s'intéresse à l'étude des métabolites secondaires qui constituent le principal réservoir des nouveaux médicaments (AVIGNON *et al.*, 2010).

Parmi les métabolites secondaires : les alcaloïdes et les flavonoïdes qui sont utilisées en thérapie comme anti-oxydants, anti-bactériens, anti-ulcéreux et anti-cancéreux (HADDOUCHI *et al.*, 2006). Ces composés conduisent au développement de nouveaux produits puissants qui inhibent la progression de plusieurs maladies comme les tumeurs (AKINBORO *et al.*, 2007). Un criblage des plantes ayant une activité antimitotique pourrait donc ouvrir des perspectives nouvelles dans la recherche fondamentale sur le cancer.

A ce sujet nous sommes intéressés à la plante médicinale, *Peganum harmala* L. ou « Alharmel ». Elle est abondante dans les zones subdésertiques d'Afrique du Nord, dans certaines régions d'Europe, en Asie et dans le sud de la Russie (BOUROGAA *et al.*, 2015). Ses différentes parties sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies humaines telles que le lumbago, l'asthme, les coliques, la jaunisse et comme stimulant emménagogue (BUKHARI *et al.*, 2008). Elle a également des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antidiabétiques, antitumorales, antileishmania, insecticides et des activités cytotoxiques, ainsi que des effets hépato-protecteurs (JINOUS et FERESHTEH, 2012). Au cours des dernières décennies, plus d'attention a été donnée à ses activités antimitotiques (BOEIRA *et al.*, 2001 ; ADHAMI *et al.*, 2011).

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance et valorisation de *Peganum harmala* par l'évaluation *in vitro* de l'effet antimitotique des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala* de la région de Laghouat (Algérie) Sur la mitose des cellules méristématiques de l'oignon (*Allium cepa*).

Notre travail est structuré en deux parties :

- Une synthèse bibliographique qui met l'accent sur les métabolites secondaires, et sur la description botanique et phytochimique de la plante étudiée et de ses utilisations. Un rappel sur le cycle cellulaire, et des

INTRODUCTION GENERALE

généralités sur les antimétabolites et les principales classes d'antimétabolites d'origine végétale.

- Une partie expérimentale : incluant le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail, et la discussion des résultats obtenus.

Partie bibliographique

I. Généralités sur les métabolites secondaires d'origine végétale

1.1. Définition

Les végétaux produisent des substances chimiques de structures variées comme les métabolites primaires et secondaires (EDEAS *et al.*, 2007). Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, terpènes, les alcaloïdes), qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents : la pharmacologie ou l'agroalimentaires (MACHEIX *et al.*, 2005).

1.2. Les différentes classes de métabolites secondaires

1.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques (Figure 1) naturels regroupent plus de 8000 substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux (BAMFORTH, 1999).

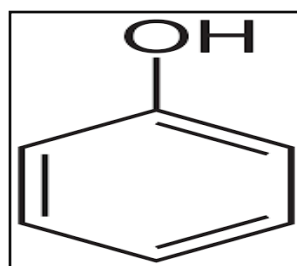


Figure 1 : Structure chimique d'un phénol simple (BAMFORTH, 1999).

Selon RICHTER (1993). Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- voie de schikimate : qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;
- voie des acétates : qui conduit à des polyacétates, menant par cyclisation à des composés polycycliques.

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, le tableau I présente les différentes classes des composés phénoliques (MACHEIX *et al.*, 2005) :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I : Les principales classes de composés phénoliques (MACHEIX *et al.*, 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes ✓ Flavonols ✓ Anthocyanes ✓ Flavanols ✓ Flavanones	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
(C6-C3)2	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3)n	Lignines		Bois, noyaux des fruits
(C6C3C6)n	Tannins		Raisin rouge, kaki

1.2.2. Les terpènes

Ce sont des molécules hydrocarbonées produites particulièrement au niveau des organes foliaires. Les différentes voies métaboliques dont ils sont issus sont la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie du shikimate, ainsi que la voie du méthylérythritol phosphate (MEP). L'unité de base des terpènes est l'isoprène en cinq carbones (Figure 2) (RICHTER, 1993).

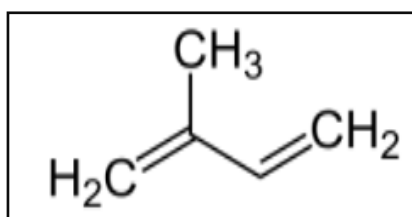


Figure 2 : Structure chimique d'isoprène (RICHTER, 1993).

Chez les plantes supérieures, les isoprénoides sont synthétisés par deux voies biochimiques indépendantes, voie de mévalonate et la voie desoxyxylulose-5- phosphate (SHARKEY, 1991).

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les terpènes ou monoterpènes en C₁₀, les sesquiterpènes en C₁₅, les diterpènes en C₂₀, les triterpènes C₃₀, et les tétraterpènes C₄₀ (GUIGNARD, 1996).

1.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont d'origine naturelle, le plus souvent végétale. Ce sont des substances organiques azotés et basiques (Figure 3), doués à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées. A l'état naturel, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tartrates, malates...) ou combinés à des tanins (BRUNETON, 2009).

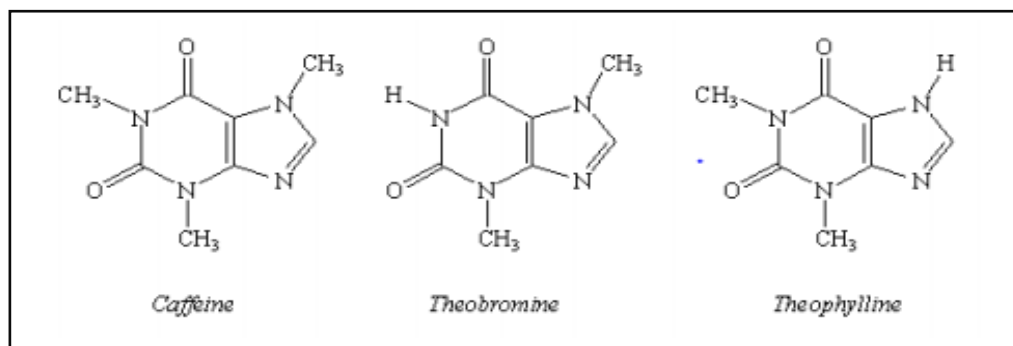


Figure 3 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes (BRUNETON, 2009).

- **Classification selon l'origine biosynthétique**

On distingue 3 classes d'alcaloïdes :

-**Alcaloïdes vrais** : Ils sont bio-synthétiquement formés à partir d'un acide aminé (BRUNETON, 1999) ;

-**Pseudo alcaloïdes** : Ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (BRUNETON, 1999) ;

-**Proto-alcaloïdes** : se sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés (BRUNETON, 1999).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

II. Généralités sur la plante médicinale : *Peganum harmala* L.

2.1. Aperçu sur *Peganum harmala* L.

La famille des zygophyllacées, une petite famille de plantes dicotylédones et angiospermes qui rassemble plus ou moins 240 espèces réparties essentiellement dans les zones arides des régions tropicales et subtropicales (LAVERGNE, 2013). Le genre *Peganum* tient son nom du grec et est attribué aux espèces de la rue, alors que le nom de l'espèce *harmala* dérive de celui de la ville Libanaise Hermel (MARS, 2009). Il comprend des espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces (TAHRI *et al.*, 2004). *Peganum harmala* est une espèce endémique des zones semi- arides, qui se développe dans les zones sahariennes du Nord du continent africain et se prolonge jusqu'au Nord de l'Inde et le Nord de la Chine (ABBASSI *et al.*, 2003). Cette plante s'appelait en français, rue sauvage, rue verte et Pegane. Les arabes l'ont appelé Harmel, Armel et Bizr elharmel. En Algérie, elle est connue par le nom Harmel et Harmel Sahari (HAMMICHE et MERAD, 1997).

2.2. Classification botanique

Selon OZENDA (1977), la systématique de l'espèce *Peganum harmala* L. est synthétisée dans le tableau suivant :

Tableau II : Classification botanique de *Peganum harmala* L. (OZENDA, 1977).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindoles
Famille	Nitrariaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i> L.

2.3. Description botanique

Le Harmel est une plante herbacée, vivace, glabre (OZENDA, 1958), buissonnante de 30 à 90 cm d'hauteur, à rhizome épais, à odeur forte qui rappelle celle de la rue (Figure 4a), avec

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

des tiges dressées, très rameuses, portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites (HAMMICHE et MERAD,1990).

Les fleurs sont blanches en étoiles, avec 5 sépales persistants qui dépassent la corolle, 5 pétales elliptiques, étamines nombreuses (jusqu'à 15) à anthère jaune (Figure 4b). Le fruit est une capsule plus ou moins globuleuse, déprimée au sommet (PARIS et DILLEMANN, 1960), qui renferme de nombreuses petites graines de couleur marron foncée, comme présentant la figure (Figure 4c ; 4d) dont le tégument externe est réticulé. Elles ont une saveur amère et sont récoltées en été. (CHOPRA *et al.*, 1960).



a) arbuste



b) fleur



b) fruit



d) graines

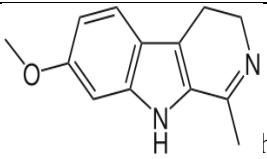
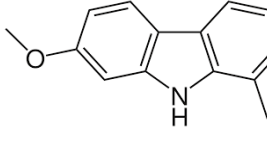
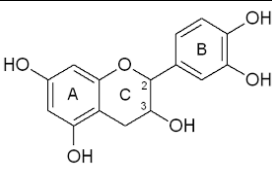
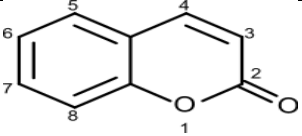
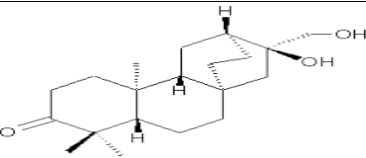
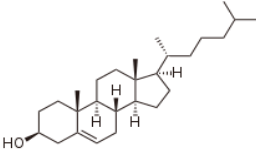
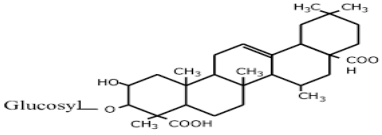
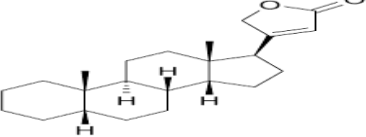
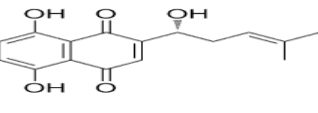
Figure 4 : Les différentes parties de *Peganum harmala* L. (RONSE DECRAENE *et al.*, 1996).

2.4. Phytochimie et propriétés pharmacologiques de *Peganum harmala* L.

Selon les résultats de l'étude de SASSOUI *et al.* (2016), les différents organes (feuilles, tiges, fruits et graines) de *Peganum harmala* L. récoltés en trois mois (Juin, Juillet et Août), montrent la présence de divers principes actifs, dont la présence est variable d'une période à une autre, dont les principaux sont présentés dans le tableau III :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau III : Les principaux principes actifs de *Peganum harmala* L. (SASSOUI *et al.*, 2016).

Principe actif	Structure chimique	références
Alcaloïdes	 <p style="text-align: right;">harmaline</p>	(BENBOTT <i>et al.</i> , 2013)
	 <p style="text-align: right;">harmine</p>	
Flavonoïdes		(ANDERSEN et MARKHAM, 2006)
Coumarines		(BRUNETON, 2009)
Terpènes et stérols	 <p style="text-align: center;">Ditèrène</p>	(ASHTON, 2013)
	 <p style="text-align: center;">stérols</p>	
Saponosides		(BRUNETON, 2009)
Cardinolides		(PICKARD, 2009)
Quinones		(SCHWEITZER-STENNER et UVERSKY, 2012).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tout les organes de *Peganum harmala L.* présentent de multiples principes actifs dont les principaux sont les alcaloïdes de type b-carboline, tel que l'harmine et l'harmaline (BENBOUTT *et al.*, 2013), des flavonoïdes (ANDERSEN et MARKHAM, 2006), et des coumarines (SASSOUI *et al.*, 2016).

En plus de ces composées, des composés terpéniques, des saponosides et des cardinolides sont également détectés (SASSOUI *et al.*, 2016).

2.5. Les activités biologiques des principaux métabolites secondaires de Harmel

En raison de sa richesse en composées bioactives, *Peganum harmala L.* possède divers activités biologiques.

Les alcaloïdes issus de *Peganum harmala L.* possèdent une activité antalgique (FAROUK *et al.*, 2009), antioxydante (BAGHIANI *et al.*, 2012). De plus, la présence de ces alcaloïdes pourrait impliquer des activités intéressantes, notamment antibactérienne (DARABPOUR *et al.*, 2011), antiparasitaire (RAHIMI-MOGHADDAM *et al.*, 2011), et antifongique (NENNAH, 2010).

Les flavonoïdes, possèdent certaines propriétés antiallergiques, antispasmodiques et antioxydantes (ANDERSEN et MARKHAM, 2006), et les coumarines sont connues pour leurs propriétés antiœdémateuses (BRUNETON, 2009).

La présence des dérivés terpéniques pourrait expliquer la capacité de soigner les troubles de l'hypertension, le diabète et les anuries (ASHTON, 2013). Les saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives (BRUNETON, 2009), et les cardénolides ont montré une activité anti-tumorale contre plusieurs types de cellules cancéreuses (PICKARD, 2009). Par ailleurs, les quinones sont connues par leurs propriétés antibactériennes et antivirales (SCHWEITZER-STENNER et UVERSKY, 2012).

2.6. Utilisation de *Peganum harmala L.* en médecine traditionnelle

Depuis un temps reculé, *Peganum harmala L.* semble avoir été utilisé par les populations de l'ancien monde et particulièrement de l'Orient comme une plante médicinale. Le Harmel est très utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter différents troubles, les parties utilisées correspondent aux racines, feuilles et graines (HAMMICHE et MERAD, 1990) :

- les racines en décoction sont indiquées pour les hémorroïdes ;
- les feuilles en décoction sont mentionnées pour l'hypertension artérielle (IUCN 2005) ;

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

-les graines de *Peganum harmala* sont utilisées sous forme de poudre, décoction, macération ou infusion pour la fièvre, la diarrhée, l'avortement et les tumeurs sous cutanées. D'autre part, ils sont largement utilisés comme un remède pour les douleurs rhumatismales et intestinales, le diabète et l'eczéma (BELLAKHDAR, 1997).

II. Le cycle cellulaire

3.1. Définition

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation, par division de la cellule mère, et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles grâce à la mitose. Le cycle cellulaire comprend (Figure 5):

- l'interphase, qui regroupe les phases G₁, S et G₂ ;
- la phase M ou mitose au cours de laquelle la cellule se divise pour donner naissance à deux cellules filles strictement semblables (MAILLET, 2002).

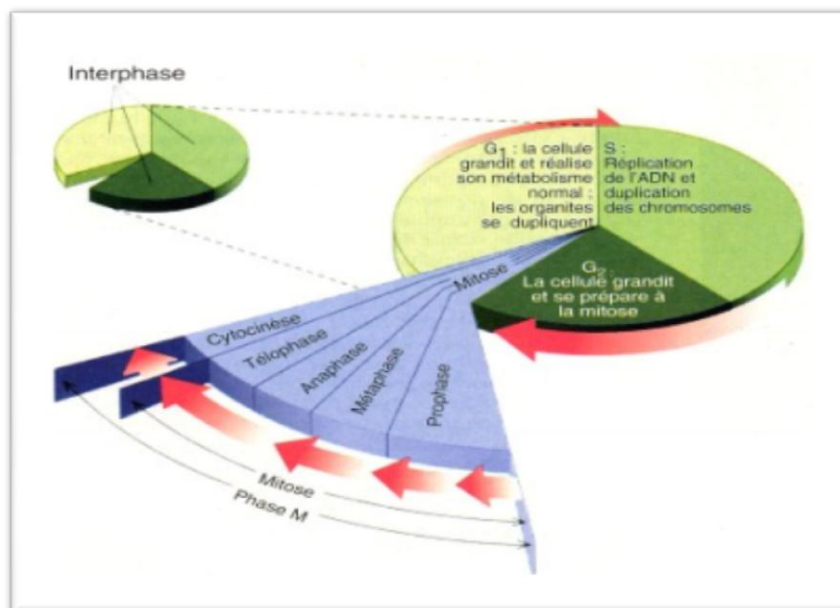


Figure 5 : Evénements observables durant le cycle cellulaire (MAILLET, 2002).

3.1.1. L'interphase

3.1.1.1. La phase G₁

C'est une phase de repos, elle est la plus longue et la plus variable du cycle cellulaire. Elle correspond à la phase de croissance optimale où les organites sont réparties dans le cytoplasme, et exploitées au mieux de leurs capacités (MEIJER, 2003).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1.1.2. La phase S

La phase de synthèse, correspond à la période de duplication d'ADN (MEIJER, 2003).

3.1.1.3. La phase G2

Elle est considérée comme une étape de transition, qui permet à la cellule de se préparer à la division mitotique (MEIJER, 2003).

3.1.2. La mitose (M)

Elle conduit à une réduction de la quantité d'ADN, par rayon et la valeur diploïde est retrouvée pour chaque cellule fille. La mitose se déroule en quatre étapes, reconnaissables morphologiquement, à savoir, prophase, métaphase, anaphase et télophase (DOLISI, 2009).

3.1.2.1. La caryocinèse

La caryocinèse comprend quatre phases : la Prophase, la métaphase, l'anaphase et télophase. Elle est produite grâce au fuseau mitotique constitué de microtubules (ALBERTS *et al.*, 1997).

3.1.2.1.1. La prophase

La prophase prépare la répartition des chromosomes (durée 15 à 60 min) (Maillet et LEMULLOIS, 2006). Durant laquelle :

- la chromatine se condense ;
- le micro filament s'allonge ;
- le nucléole commence à disparaître progressivement ;
- l'enveloppe nucléaire se dépolymérise ;
- les micros filaments et tubules se transformes et le fuseau de division apparait, comme présente la figure 6 (DOLISI, 2009).

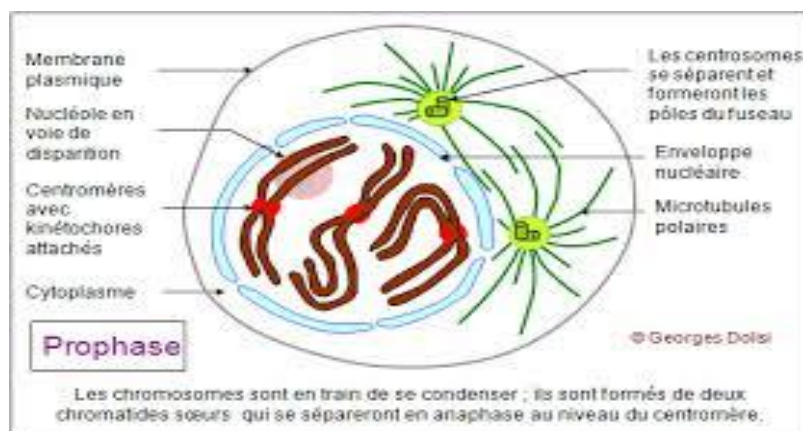


Figure 6 : Représentation schématique d'une cellule en prophase (DOLISI, 2009).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1.2.1.2. La métaphase

La métaphase dure pour quelques minutes, elle est caractérisée par :

- un rassemblement de tous les chromosomes sur la plaque équatoriale (Figure 7) ;
- condensation maximale des chromosomes ;
- le chromosome métaphasique : est au maximum de sa condensation, et est constitué de deux chromatides reliés par un centromère (DOLISI, 2009).

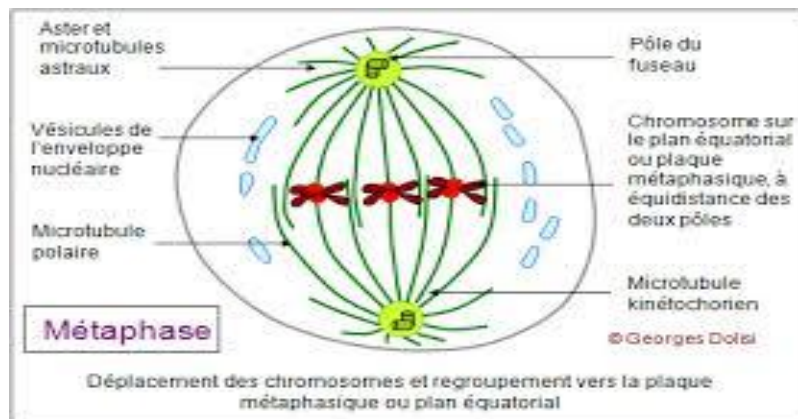


Figure 7 : Représentation schématique d'une cellule en métaphase (DOLISI, 2009).

3.1.2.1.3. L'anaphase

L'anaphase dure 2 à 3 minutes, les principales caractéristiques de cette étape sont :

- la ségrégation des deux chromatides sœurs de chaque chromosome ;
- la migration des chromosomes vers les pôles mitotiques avec raccourcissement des microtubules (Figure 8) ;
- l'allongement de la forme générale du fuseau mitotique (DOLISI, 2009).

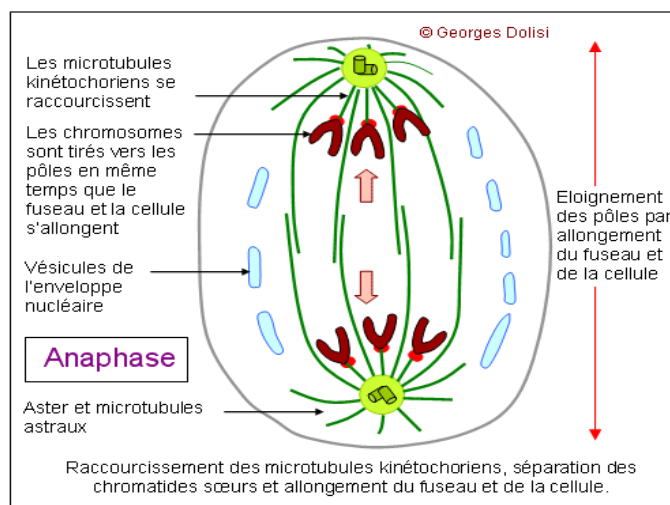


Figure 8 : Représentation schématique d'une cellule en anaphase (DOLISI, 2009).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1.2.1.4. La télophase

Le terme « télophase » dérive du grec « telos » signifiant « fin », elle dure 15 à 60 minutes.

Durant cette période (Figure 9) :

- le fuseau mitotique va disparaître petit à petit ;
- l'arrêt de migration des chromosomes ;
- les chromatides commencent à se décondenser ;
- reconstitution de l'enveloppe nucléaire, et réapparition du nucléole (DOLISI, 2009).

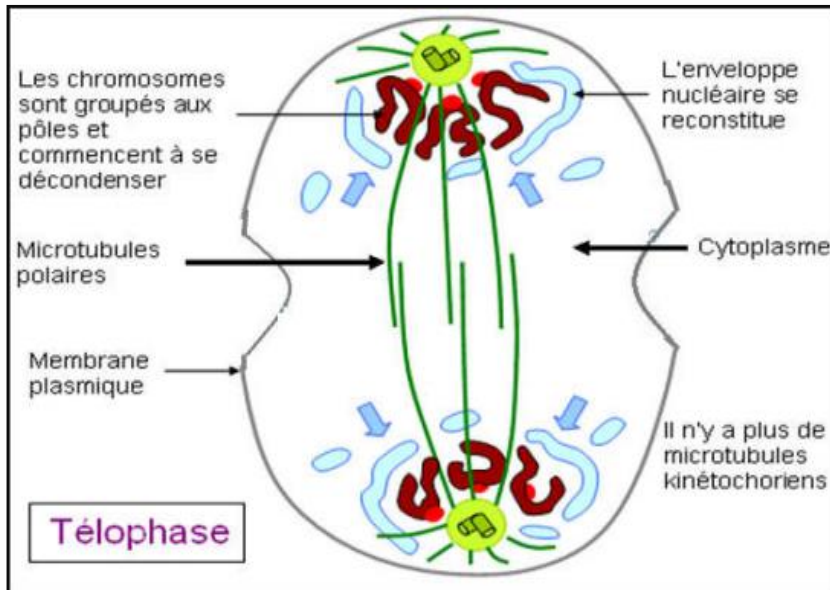


Figure 9 : Représentation schématique d'une cellule en télophase (DOLISI, 2009).

3.1.2.2. La cytodierèse

La cytodierèse est produite grâce à la plaque cellulaire (phragmoplaste) chez la cellule végétale, elle commence après la télophase ou un peu avant sa fin. Durant cette phase la cellule se contracte entre les deux jeunes noyaux jusqu'à couper le cytoplasme et à séparer les deux cellules filles, comme présente la figure 10 (DOLISI, 2009).

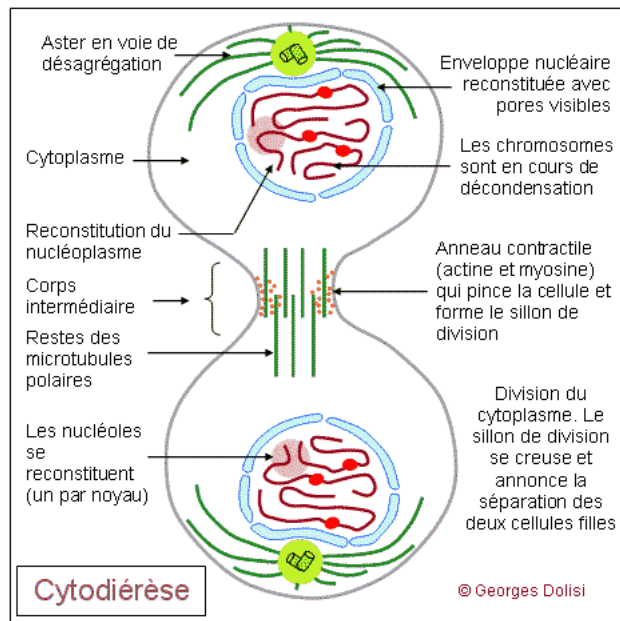


Figure 10 : Représentation schématique d'une cellule durant la cytotodiérèse (DOLISI, 2009).

3.2. La régulation et contrôle du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire permet:

- de maintenir les phases du cycle dans l'ordre ;
- de surveiller la quantité de l'ADN, la réplication exacte d'ADN, la prolifération cellulaire, et la position des chromosomes (CHEVRET, 2015).

Le contrôle du cycle cellulaire (Tableau IV) se concentre principalement sur deux points:

- la transition entre la phase G1 et la phase S ;
- la transition entre la phase G2 et l'entrée en mitose.

Le passage par ces points de contrôle du cycle cellulaire exige l'activation temporaire des Kinases cyclines-dépendantes (CDKs). (KARP, 1998).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau IV : Principales cyclines-dépendantes(CDKs) et leur rôle dans la régulation de cycle cellulaire (MEIJER ,2003).

Protéines kinases (CDK)	Cycline	Rôle
CDK4 et CDK6	Cycline D	régulent le déroulement de la phase G1
CDK2	Cycline E	assurer la transition G1/S
CDK2	Cycline A	assure le contrôle de la phase S
CDK1	Cycline A	intervient en G2
CDK1	Cycline B	régule la transition G2/M et l'entrée en mitose

Les CDKs ont une structure bilobaire et lient leur substrat et l'ATP dans une partie située entre les deux lobes. Ces dernières sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (protéine kinase) responsable de l'activité enzymatique et une sous-unité régulatrice (cycline) capable de contrôler cette activité (MEIJER, 2003).

Les CDK actives, phosphorylent leurs substrats (= protéines cibles) spécifiques sur des résidus sérine ou thréonine inclus dans une séquence consensus accessible. Ce sont ces cibles qui jouent un rôle direct dans la progression du cycle cellulaire (figure 11) après avoir vu leurs propriétés modifiées par la phosphorylation (GALAS *et al.*, 2008).

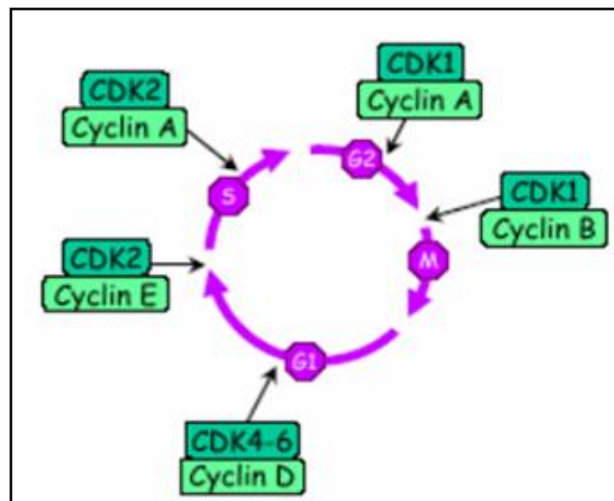


Figure 11 : Contrôle du cycle cellulaire par les kinases cyclines-dépendantes (CDKs) (MEIJER, 2003).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

IV. Les antimittotiques

4.1. Définition

Les antimittotiques sont des substances qui à faible concentration sont capable d'inhiber la mitose, de la perturber ou de l'arrêter, ou même de perturber et d'inhiber un ou plusieurs phénomènes de la préparation à la mitose (CHEVREMONT, 1979).

4.2. Classification et mécanisme d'action

Les antimittotiques sont capables d'exercer une action antimittotique spécifique (figure 12) soit sur:

- **l'ADN** : par action des agents alkylants et des agents scindant ;
- **les enzymes** : par action des antimétabolites et des antitopoisomérase ;
- **les microtubules** : par actions des poisons du fuseau mitotique (CHEVREMONT, 1979).

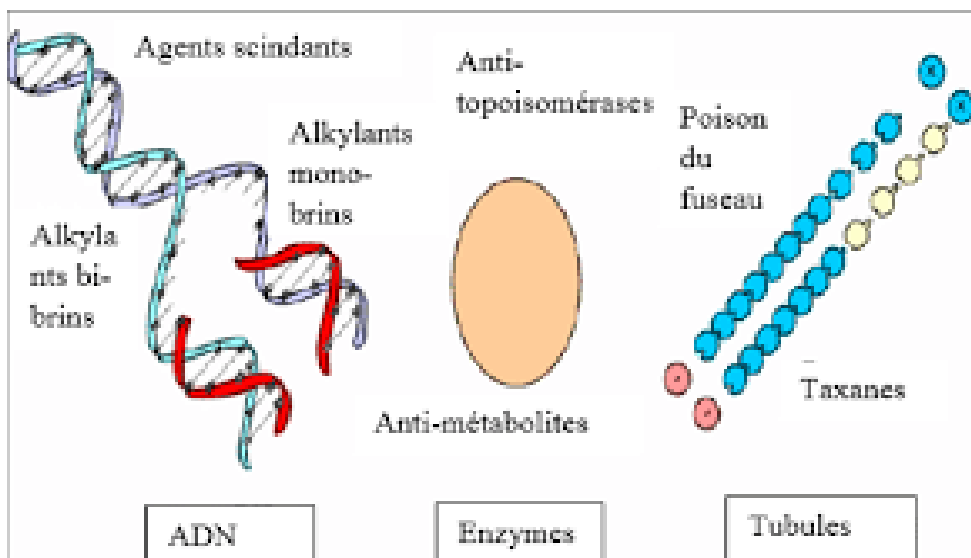


Figure 12 : Principaux sites d'action des antimittotiques (CHEVREMONT, 1979).

4.3. Microtubules et mitose

Le déroulement de la mitose est essentiellement soumis à la dynamique des microtubules qui s'organisent de façon symétriques dans la cellule à partir des deux centrosomes nouvellement séparés. Le fuseau mitotique ainsi formé assure l'alignement des

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

chromosomes sur la plaque équatoriale en métaphase et permet la séparation physique et quantitative des chromatides sœurs entre les deux cellules fille (ANOS ET BAKER, 1979).

Le microtubule est un tube creux d'un diamètre externe moyen de 25 nm, composé le plus souvent de 13 protofilaments structurés de manière linéaire et parallèle (figure 13). Il polymérise par addition d'unités hétérodimériques de tubuline α et β qui sont capables de s'auto-associer longitudinalement pour former un protofilament (VALIRON *et al.*, 2001). Les protofilaments s'associent ensuite de manière latérale pour former le microtubule. Les sous-unités de tubuline lient soit un nucléotide guanosique, GTP (sous unité α) ou bien GTP ou GDP pour la sous unité β . Les hétérodimères s'additionnent toujours selon un mode « tête à queue » au sein des protofilaments. Le microtubule est donc polarisé, l'extrémité la plus dynamique (+) expose la sous-unité de tubuline β au solvant, l'extrémité la moins dynamique (-) expose au solvant la sous-unité de tubuline α . L'addition de nouvelles sous-unités suit une dynamique différente pour chacune des extrémités du microtubule avec une cinétique plus rapide à l'extrémité (+) (MITCHISON, 1993). Les microtubules subissent un régime d'instabilité dynamique. L'élongation des microtubules est en effet transitoire et consiste en la succession de longues phases de polymérisation continue suivies d'une courte phase de dépolymérisation rapide. Le passage de la polymérisation à la dépolymérisation ou l'inverse correspond à ce qu'on appelle « instabilité dynamique ».

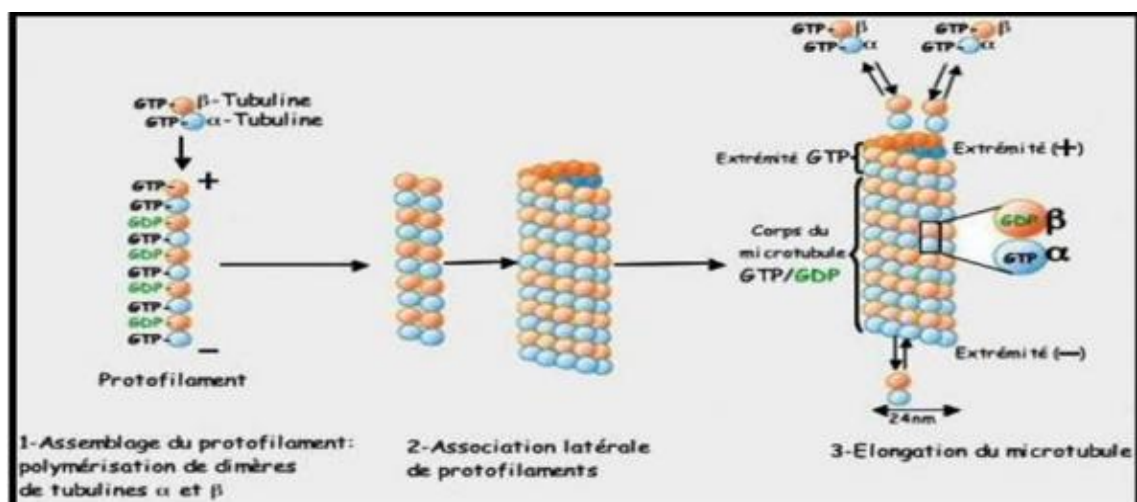


Figure 13 : Formation et structure des microtubules (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001).

Il existe deux familles de protéines « motrices » interagissent avec les microtubules à fin de déplacement des chromosomes. Ce sont les kinésines, qui se déplacent vers l'extrémité (+) du microtubule et les dynéines, qui se déplacent vers l'extrémité (-) (en direction du

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

centrosome) (figure 14). Ces protéines motrices sont toujours associées à d'autres protéines. La kinésine est associée à une chaîne protéique légère qui lui permet de fixer les chromosomes (mouvement des chromosomes le long des microtubules). La dynéine est emballée dans un complexe protéique, qui permet aussi de fixer les chromosomes, les protéines motrices utilisent l'énergie dérivée de cycles répétés d'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long du microtubule. (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001).

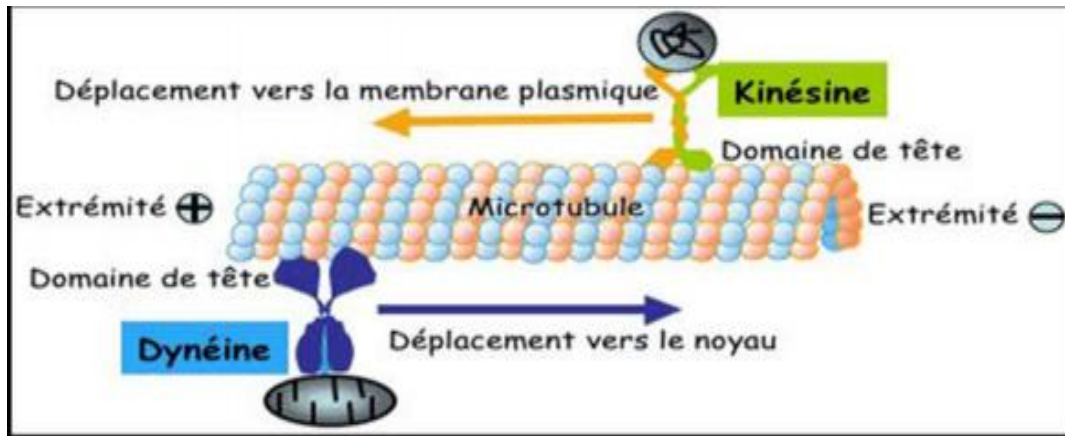


Figure 14 : Les protéines motrices des microtubules (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001).

4.4. Les principaux antimitotiques d'origine végétale et leurs mécanismes d'action

4.4.1. La colchicine

La colchicine est un alcaloïde (figure 15) extrait des tiges souterraines charnues du colchique : *colchicum autumnale* L. (Liliaceae), qui en se fixant sur une molécule de la tubuline empêche sa polymérisation en microtubules. 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).

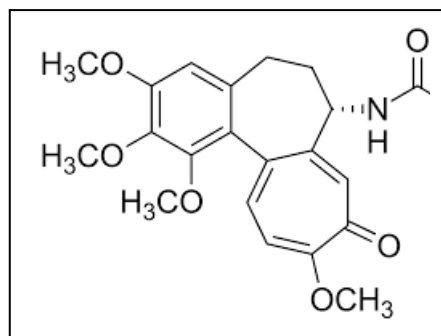


Figure 15 : Structure chimique de la colchicine (ALLAIN, 2005).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

4.4.2. Les vincaloïdes

Elles sont extraites à partir de la pervenche de Madagascar *Catharanthus roseus* G. Elle fait partie de la famille des Apocyanaceae (GUERITTE et FAHY, 2005). Cette plante produit deux principes actifs qui appartiennent à la famille des alcaloïdes (hétérocycles azotés : la vinblastine et la vincristine (Figure 16).

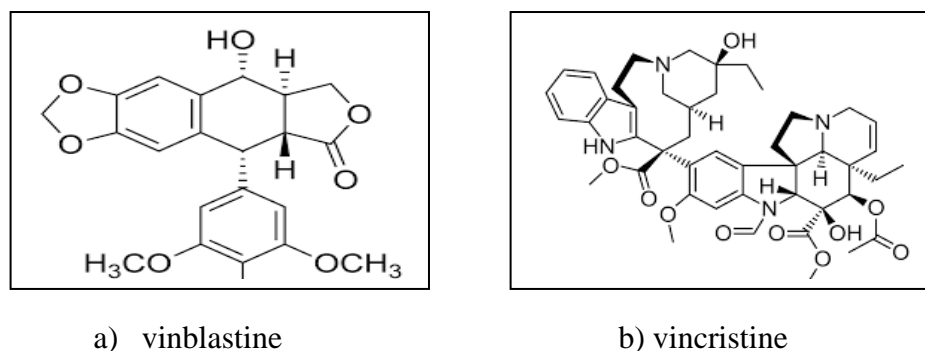


Figure 16 : Structure chimique des vincaloïdes (HAIT *et al.*, 2006).

Les vincaloïdes ont pour action d'inhiber la polymérisation de la tubuline en se liant sur la sous-unité B, après liaison avec celle-ci elles inhibent la formation des microtubules (la forme polymérique) Ceci conduit à un blocage de la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau et dispersion des chromosomes au hasard à travers le cytoplasme (EPSIE *et al.*, 1998).

4.4.3. Les Podophyllotoxines

La podophyllotoxine est extraite de *Podophyllum peltatum* L, qui fait partie de la famille podophyllaceae (Figure 17). L'effet inhibiteur est du à sa fixation à la tubuline, qui se traduit par la modification de la structure de cette protéine en la rendant impropre à la formation des microtubules(LEE et XIAO, 2005).

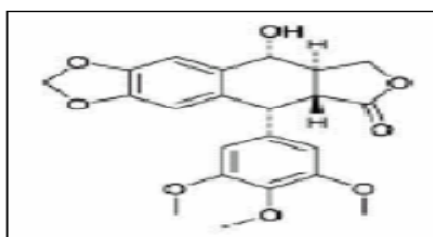


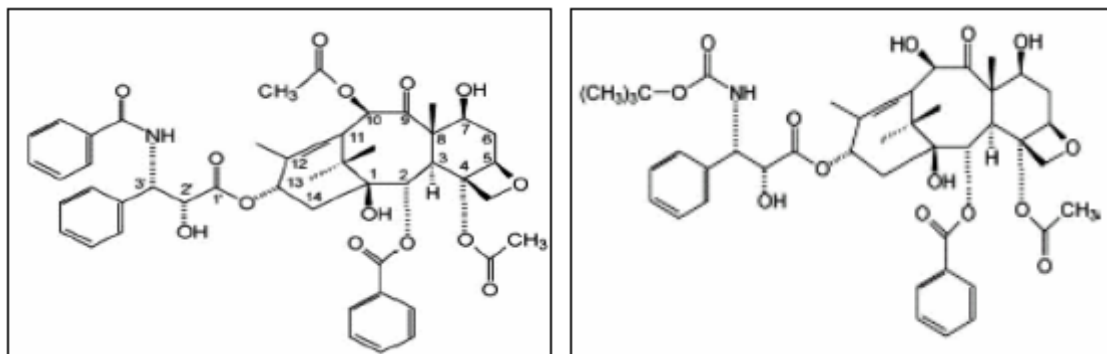
Figure 17 Structure chimique de la Podophyllotoxine (HAIT *et al.*, 2006).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

4.4.4. Le taxol

Le taxol est extrait du *Taxus baccata L.* ou du *Taxus brevifolia* qui appartiennent à la famille des *Taxaceae*. Parmi les dérivés du taxol on distingue les taxoïdes. Les taxoïdes facilitent la polymérisation de la tubuline à laquelle ils se lient spécifiquement et réversiblement, inhibant ainsi la dépolymérisation des microtubules, ils empêchent donc la formation (et disparition) du fuseau mitotique (EPSIE *et al.*, 1998).

Parmi les dérivés du taxol on distingue ceux qui correspondent aux docétaxel et paclitaxel présentés dans la figure 18 (EPSIE *et al.*, 1998).



a) Paclitaxel

b) Docétaxel

Figure 18: Structure chimique des taxanes (HAIT *et al.*, 2006).

4.4.5. La quercétine

La quercétine est l'un des flavonoïdes les plus actifs (Figure 19), elle est retrouvée naturellement dans plusieurs fruits et légumes. La quercétine inhibe le cycle cellulaire en G1 par inhibition des activités des CDK2 et CDK4, en bloquant les sites récepteurs des hormones (MARFAK, 2003).

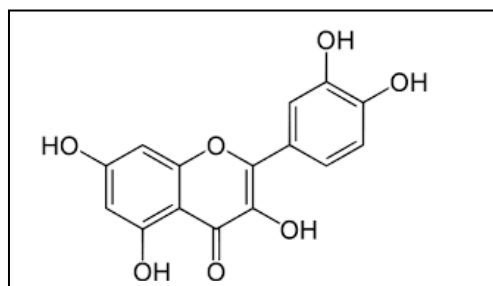


Figure 19: Structure chimique de la quercétine (MARFAK, 2003).

Partie expérimentale

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au Laboratoire des ressources naturelles de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, son objectif consiste en la détermination des effets antimitotique *in vitro* des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala L.* Cette étude est une continuation des travaux réalisés par le docteur OUZID Y, qui a travaillé sur les extraits fongiques des feuilles de *Peganum harmala*, et la poudre des feuilles utilisées dans ce travail est préparée par lui.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

Les feuilles de *Peganum harmala L.* ont été récoltées au mois d'avril 2015, dans la région de Timzerth dans Dayat Aiat au sud de la wilaya de Laghouat (Figure 20).



Figure 20 : La situation géographique de la zone d'étude (Google Maps).

Les racines jeunes d'*Allium cepa L.* (oignon). Ont servi comme un modèle testeur. Le choix de cette plante est du à plusieurs avantages:

- division cellulaire rapide;
- nombre chromosomique réduit ($2n=16$);
- chromosomes larges et longs (observation microscopique facile) ;
- matériel végétal disponible et facile à cultiver.

-Les oignons utilisés dans cette étude sont achetés dans des marchés locaux.

PARTIE EXPERIMENTALE

1.1.2 Matériel de laboratoire

Le matériel usuel de laboratoire est mentionné dans l'annexe 1.

1.1.3 Solvants et réactifs

Les solvants et les réactifs utilisés dans cette étude ainsi que leur concentration sont illustrés dans le tableau suivant:

Tableau V: solvants et réactifs utilisés

Solvants et réactifs	Concentration	Rôle
Colchicine	1mg/ml	Agent antimittotique
Quercetine	1mg/ml	Agent antimittotique
Solvant de fixation	Acide acétique ; éthanol (1/3)	Bloque la mitose et conserve et intégrité chromosomique
Solution de coloration (Carmin acétique)	Inconnu	Coloration des chromosomes en rouge.

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des extraits méthanoliques

5g de la poudre de feuilles de *Peganum harmala L.* sont mis dans 50 ml du méthanol, le mélange à été bien agiter par un agitateur magnétique, ensuite une centrifugations de 2500 Trs pendant 10 minutes a été réalisée afin de récupérer le surnageant, ce dernier a été récupéré et évaporé à température ambiante en abris de la lumière . Différentes concentrations (16 mg/ml ; 10 mg/ml ; 4mg/ml et 1mg/ml) ont été préparé à l'aide de l'eau distillé, pour les manipulations ultérieures, comme montre le protocole dans la figure 21 .

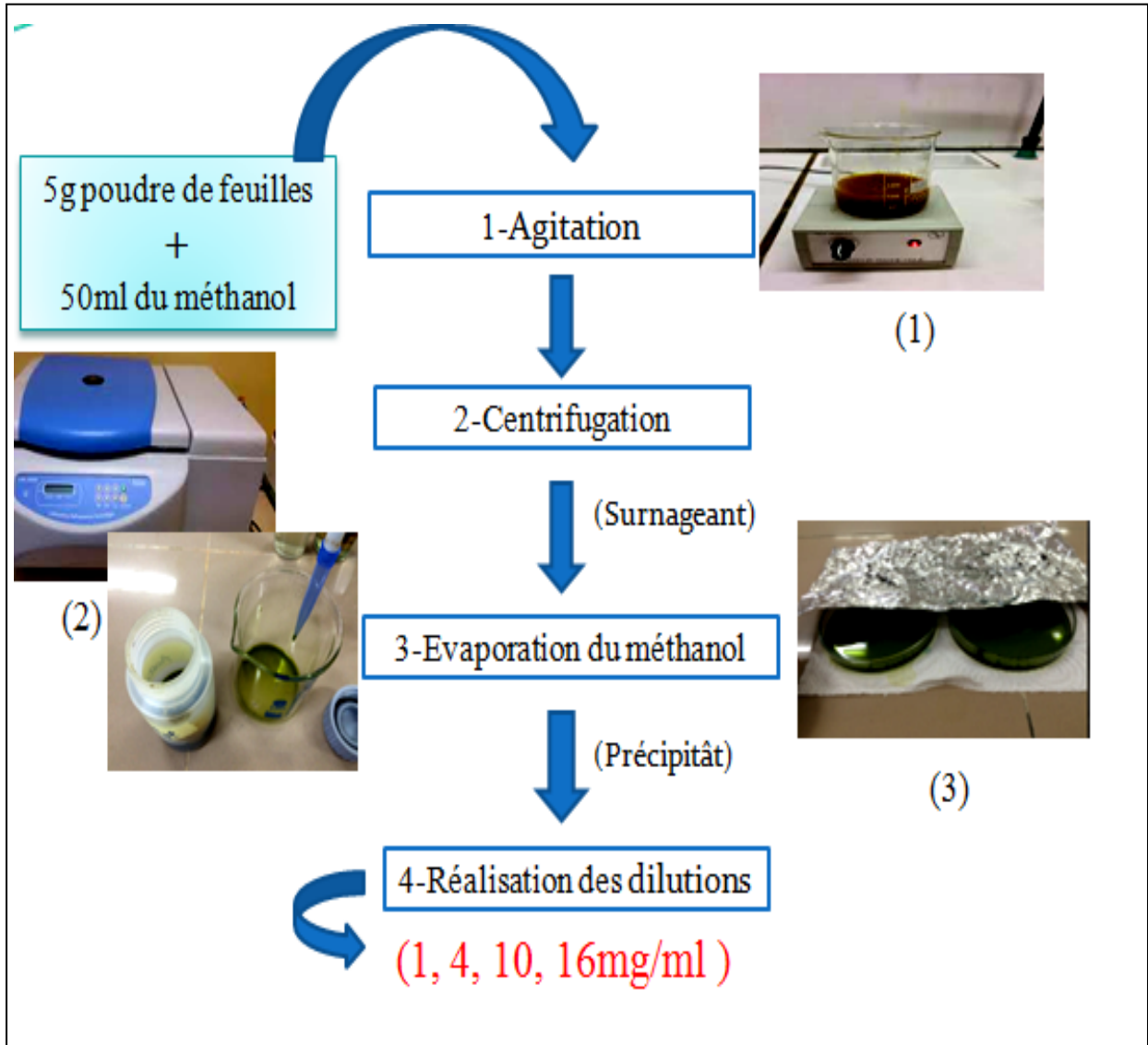


Figure 21: Schéma du protocole expérimental de la préparation des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala L.*

Les différentes dilutions (1, 4, 10, 16 mg/ml) ont été testés sur des extrémités racinaires (cellules méristématiques), et pour la préparation de ces dernières, on a adopté le protocole expérimental de SHWETA *et al* (2012), modifié par nos soins, ces différentes étapes sont illustrées dans la figure 22.

PARTIE EXPERIMENTALE

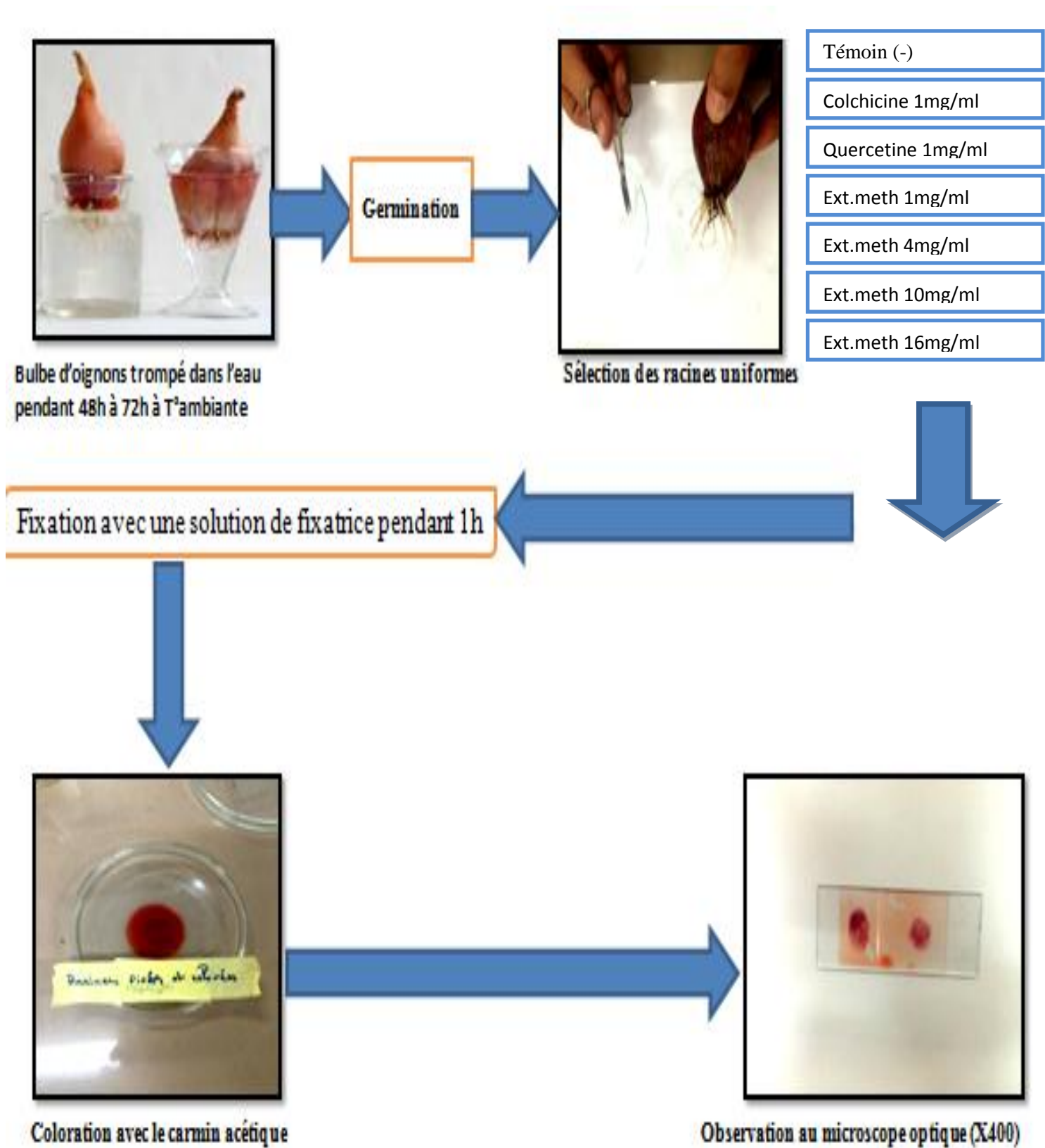


Figure 22 : Schéma du protocole expérimental de l'évaluation *in vitro* de l'activité antimitotique.

PARTIE EXPERIMENTALE

1.2.2. Evaluation *in vitro* de l'activité antimittotique des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala L.*

L'évaluation *in vitro* de l'activité antimittotique des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala L.* a été réalisée suivant le test *Allium cepa L.* (SHWETA *et al.*, 2012). Des concentrations ont été testées à savoir : 16mg/ml ; 10mg/ml ; 4 mg/ml et 1mg/ml. Ainsi que deux standards qui sont la colchicine (1mg/ml) et la quercétine (1mg/ml).

Des bulbes d'oignons (*Allium cepa L.*) ont été mis à germer dans de l'eau pendant 48 à 72 heures à température ambiante afin d'obtenir des racines contenant des cellules méristématiques en division.

La croissance des racines résulte des mitoses qui se produisent dans le méristème racinaire située dans la zone subapicale de la racine. Ces zones méristématiques ont été sélectionnées pour former des échantillons : deux ont été considérées comme des témoins positifs, un a été traité pendant 24 heures par la colchicine (1mg/ml) et l'autre par la quercétine (1mg/ml) (24h). Ces deux composés ont un effet antimittotique connu. Quatre échantillons ont été traités par les extraits méthanoliques préparés : 16mg/ml ; 10mg/ml ; 4mg/ml ; 1mg/ml, pendant 24 heures.

5 lames ont été examinées pour chaque concentration (échantillon), ainsi que les deux standards.

Tous les échantillons ont été soumis à une analyse cytologique, qui comprend les étapes suivantes :

La fixation : les apex racinaires d'un centimètre environ de longueur (1cm), ont été enrobés dans la solution de fixation, préparée d'un volume d'acide acétique et de trois volumes d'éthanol (1:3v/v) pendant 24 heures.

La fixation a pour but de bloquer toute évolution de division cellulaire et permet de conserver l'intégrité structurale de chromosomes (JAHIER, 1992).

La coloration : la coloration a été effectuée en utilisant le carmin acétique qui est généralement préférée pour l'obtention d'un bon contraste entre les chromosomes et le cytoplasme incolore (JAHIER, 1992).

Préparation des lames : la partie méristématique sélectionnée et colorée a été déposée sur une lame à l'aide d'une pince, dans une goutte de carmin acétique et écrasée entre lame et

PARTIE EXPERIMENTALE

lamelle en tapotant doucement avec le bout des doigts, afin d'obtenir un bon étalement des cellules.

Evaluation microscopique : L'observation et l'examen des lames a été réalisée dans le but de la détermination des :

- indices mitotiques (IM%) ;
- indices de phases (IP %) ;
- indices des aberrations (IA%) ;
- valeurs limites de cytotoxicité (VLC%).

- **Indice mitotique (IM%) :** il est défini par le ratio de cellules en division normal sur le total des cellules comptées (350cellules) (IKEDA *et al*, 2000) selon l'équation suivante:

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

- **Indice des phases (IP%) :** il est déterminé par le nombre de cellules en prophase (P), en métaphase (M), en anaphase (A) et en télophase(T) sur le nombre de cellules examinées (350) multiplié par 100 (GLINSKA *et al.*, 2007), selon la formule suivante :

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

- **Valeur limite de cytotoxicité (VLC) :** elle est calculée selon ANTONSIE-WIEZ. (1990) à partir de la formule suivante :

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

PARTIE EXPERIMENTALE

- **Indices des aberrations (IA%)** : selon RACUCIU et CREANGA. (2007), l'indice des aberrations est calculé à partir de l'équation suivante :

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

II. Résultats et discussions

- **Indices mitotiques (IM)% et Valeurs limites de cytotoxicité (VLC)%**

Notre étude a révélé que les cellules méristématiques d'*A. cepa* L. ayant subi aucun traitement (témoin négatif) avaient une moyenne d'indice mitotique de $87.74 \pm 1.37\%$ (Tableau VI). Toutes les phases de la mitose ont été nettement observées à savoir: la prophase ; la métaphase ; l'anaphase et la télophase comme le montre la figure (Figure 23).

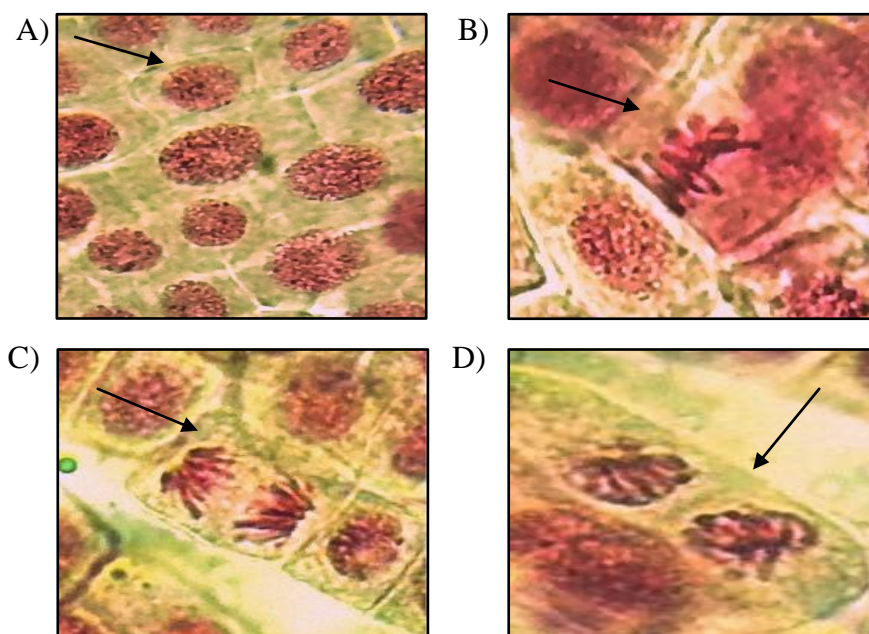


Figure 23 : Les différentes phases de la mitose rencontrées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* (témoin négatif) (X400).

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

La mitose désigne le processus de la division cellulaire, durant laquelle on observe la division du noyau appelée caryocinèse, et la division du cytoplasme nommée la cytokinèse. La caryocinèse comprend différentes étapes : tout d'abord, la prophase qui correspond à la condensation des chromosomes et la rupture de l'enveloppe nucléaire, puis intervient la métaphase, période de la formation du fuseau et l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, puis suivra l'anaphase qui est caractérisée par la disjonction de ces derniers, et enfin la télophase: disparition du fuseau et les chromosomes se décondensent et dirigent vers

PARTIE EXPERIMENTALE

les pôles, puis la cytokinèse durant laquelle la cellule se sépare en deux cellules filles (MEIJER, 2003).

Tableau VI: Les indices mitotiques obtenues chez les cellules du le témoin négatif.

Phases Lames	P	M	A	T	IM %
(lame 1)	230	10	16	42	85,14 %
(lame 2)	236	7	5	66	89,71 %
(lame 3)	210	4	5	74	83,75 %
(lame 4)	161	2	6	154	92,28 %
(lame 5)	206	2	4	94	87,81 %

P : Prophase M : Métaphase A : Anaphase T : Télophase ; IM (%) : Indice mitotique en pourcentage

L'analyse des cellules traitées par la colchicine (1mg/ml) et par la quercetine (1mg/ml), révèle une diminution remarquable de la moyenne de l'indice mitotique (tableau VII) dont le taux à atteint $33,88 \pm 1,70\%$ pour la colchicine, ce ci est en accord avec le résultat retrouvées par OUZID *et al.*, (2019) qui a trouvé un indice mitotique de $34 \pm 1,07\%$ en utilisant l'extrait fongique de feuilles de *Peganum harmala* L. on a trouvé un IM de $43,88 \pm 0,46\%$ pour la quercetine, ce qui correspond à la moitié de celui calculé pour le témoin négatif, traduisant l'effet antimitotique de ces agents. La colchicine est un alcaloïde végétale qui bloque la formation du fuseau mitotique, elle se fixe sur la tubuline et empêche sa polymérisation en microtubule, l'absence ou l'insuffisance de ces dernières entraine le blocage de la mitose au stade métaphase. Quand à la quercetine, qui est un flavonoïde de type flavonol agit directement par inhibition de la protéine kinase (LALAOUI *et al.*, 2004).

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau VII: Les moyennes des indices mitotiques et valeurs limites de cytotoxicité obtenues.

Indices Extraits	IM \pm ES (%)	VLC \pm ES (%)
Témoign négatif	87,74 \pm 1,37	--
Colchicine (1mg/ml)	33,88 \pm 1,70	38,61 \pm 1,94
Quercetine (1mg/ml)	43,80 \pm 0,46	50,00 \pm 0,52
Ext. meth (16mg/ml)	1,25 \pm 0,20	1,21 \pm 0,25
Ext. meth (10mg/ml)	14,11 \pm 0,32	16,07 \pm 0,37
Ext. meth (4mg/ml)	29,76 \pm 0,50	33,92 \pm 1,24
Ext. meth (1mg/ml)	35,93 \pm 0,62	40,95 \pm 0,70

Ext.meth : Extrait méthanolique.
 IM : Indice mitotique.
 VLC : valeur limite de cytotoxicité.
 ES : Erreur standard.

Pour ce qui est des indices mitotiques obtenus en présence des extraits méthanoliques de feuilles de *Pegnum harmala* L. On remarque une forte diminution suite à l'augmentation des concentrations (figure 23). Le tableau VII montre que les indices sont de 1,25 \pm 0,20% pour la concentration 16mg/ml ; 14,11 \pm 0,32%, 29,76 \pm 0,50% et de 35,93 \pm 0,62% pour les concentrations 4 mg/ml et 1mg/ml respectivement.

L'étude statistique type ANOVA a révélé une différence hautement significative entre les indices mitotiques des extraits méthanoliques des feuilles de *P.harmala* L., de témoin négatif et les deux standards (colchicine et quercetine) (P= 0,00). Ce qui démontre un effet antimitotique de nos extraits à différentes concentrations (1, 4, 10 et 16 mg/ml) ainsi que la colchicine et la quercetine (1 mg/ml).

Les comparaisons multiples des moyennes (Test Newman Keuls) ont révélé la formation de 6 groupes (Tableau VIII). La moyenne de l'IM de l'extrait méthanolique des feuilles de *Peganum harmala* L. à la concentration 1mg/ml (35,94%) est classée entre la moyenne de la colchicine (33,88%) et celle de la quercetine (43,88%). De ce fait, l'extrait méthanolique à la concentration 1mg/ml, possède un effet supérieur à celui de la quercetine (1 mg/ml), ce ci suggère que ce dernier contient dans sa composition des composés bioactifs avec le même effet que les standards (alcaloïdes et flavonoïdes).

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau VIII : Comparaison multiple des moyennes des indices mitotiques des différents extraits.

	Groupe	Moyenne
Niveau Ext meth 16	A	1,25
Niveau Ext meth 10	B	14,11
Niveau Ext meth 4	C	29,77
Niveau COL	CD	33,88
Niveau Ext meth 1	D	35,94
Niveau QUE	E	43,88
Niveau T-		87,74

Ext.meth : Extrait méthanolique ;
COL : Colchicine 1 mg/ml ;
QUE : Quercetine 1mg/ml ;
T- : Témoin négatif.

La diminution de l'activité antimitotique, indique un effet mitodépressif de l'extrait méthanolique de feuilles de *Peganum harmala* L. pour toutes les concentrations testées. La même étude a été réalisée en utilisant l'acétate d'éthyle comme un solvant d'extraction a révélé des résultats comparables. Ainsi une diminution de l'indice mitotique a été observée chez les cellules méristématiques d'*A. cepa* L. traitées par une infusion des feuilles *Maytenus ilicifolia* et de *Banchiniq candicans* (CAMPAROTO *et al.*, 2002)

Peganum harmala L. est connue par sa richesse en alcaloïdes (harmines, harmalines...etc), phénols, terpènes et saponosides dont l'activité cytotoxique a été largement étudiée (FASLA ,2009). Selon EL-CHAMERY *et al.*, (2003), les composants contenus dans un extrait doivent interférer avec le développement normal de la mitose, en prévenant un nombre de cellules d'entrer en prophase et bloquent ainsi le cycle mitotique durant l'interphase. La réduction de l'activité mitotique pouvait être due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et des nucléoprotéines de la synthèse biologique, ou à une prolongation de la durée des phases G2 et S (WEBSTER et DAVIDSON ,1969).

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. Cet indice permet d'évaluer les effets antimitotiques et génotoxiques des divers extraits naturels, quand il diminue en dessous de 22% du témoin négatif il provoque un effet létal sur les organismes test. Une diminution de ce dernier de 50% par rapport au témoin est habituellement un effet sublétal, et est nommée valeur limite de cytotoxicité (MARCANO *et al.*, 2006).

PARTIE EXPERIMENTALE

Selon les définitions précédentes on pourra déduire que l'extrait méthanolique des feuilles de *P.harmala* est considéré comme létal pour les cellules méristématiques d'*A. cepa* traitées par les concentrations 16 mg/ml et 10 mg/ml, et on a obtenus une VLC de $33,92 \pm 1,24\%$ et $40,95 \pm 0,70\%$ respectivement, les extraits à 4mg/ml et 1mg/ml, et les deux standards sont considérés comme sublétal. La lecture du tableau VII montre qu'à la même concentration (1mg/ml), la VLC des standards est de $38,61 \pm 1,94\%$ pour la colchicine et de $50 \pm 0,52\%$ pour la quercetine, ça veut dire que la quercetine est moins toxique de la colchicine, qui a un effet comparable de celui de l'extrait méthanolique des feuilles de *P.harmala L.* à 1mg/ml ($40,95 \pm 0,70\%$). On remarque aussi que l'augmentation de la concentration des extraits méthanoliques est attribuée par une diminution des VLC.

L'étude statistique type ANOVA a révélé une différence hautement significative entre les valeurs limites de cytotoxicité des extraits méthanoliques des feuilles de *P.harmala L.*, témoin négatif et les deux standards (colchicine et quercetine) ($P= 0,00$). Ce qui démontre un effet cytotoxique de nos extraits à différentes concentrations (1, 4, 10 et 16 mg/ml) ainsi que la colchicine et la quercetine (1 mg/ml).

Les comparaisons multiples des moyennes (Test Newman Keuls) ont révélé la formation de 5 groupes (Tableau IX). La moyenne de la VLC de l'extrait méthanolique des feuilles de *Peganum harmala L.* à la concentration 1mg/ml (40,88%) est classée entre la moyenne de la colchicine (38,62%) et celle de la quercetine (50,00%). De ce fait, l'extrait méthanolique à la concentration 1mg/ml, possède un effet plus toxique supérieur à celui de la quercetine (1 mg/ml), utilisée comme flavonoïde standard.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau IX : Comparaison multiple des moyennes des valeurs limites de cytotoxicité des différents extraits.

	Groupe	Moyenne
Niveau Ext meth 16	A	1,42
Niveau Ext meth 10	B	16,08
Niveau Ext meth 4	C	33,92
Niveau COL	CD	38,62
Niveau Ext meth 1	D	40,88
Niveau QUE		50,00

Ext.meth : Extrait méthanolique ;

COL : Colchicine 1 mg/ml ;

QUE : Quercetine 1mg/ml ;

T- : Témoin négatif.

- **Indices de phases (IP)%**

Les pourcentages des différentes phases de la mitose calculées sur l'ensemble des cellules examinées sont rapportés dans le tableau (X), on a calculé à la concentration 16mg/ml un indice de prophase de $1,13 \pm 0,17\%$ et un indice de télophase de $0,11 \pm 0,10\%$. Il est a noté que l'indice de prophase est relativement le plus élevé, et se diminue on augmentant les concentrations des extraits méthanoliques préparés, suivie par celui de la télophase. Par rapport à la métaphase et l'anaphase sont minoritairement présent, et dans la plus part des cas leurs présence est nulle.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau X : Les moyennes des indices de phases comparées au témoin.

Indices Extraits	IM ± ES(%)	IP ± ES (%)	Im ± ES(%)	IA ± ES (%)	IT ± ES (%)
Témoin (-)	87,74 ± 1,37	59,60 ± 3,38	1,42 ± 0,39	2,05 ± 0,56	24,57 ± 4,83
Colchicine (1mg/ml)	33,88 ± 1,70	32,05 ± 1,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,82 ± 0,40
Quercetine (1mg/ml)	43,88 ± 0,46	40,57 ± 0,90	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,26 ± 1,07
Ext.meth (16mg/ml)	1,25 ± 0,20	1,13 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,10
Ext.meth (10mg/ml)	14,11 ± 0,32	12,51 ± 0,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,60 ± 0,33
Ext.meth (4mg/ml)	29,76 ± 0,50	20,28 ± 0,84	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,48 ± 0,54
Ext.meth (1mg/ml)	35,93 ± 0,62	26,85 ± 0,99	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,04	9,02 ± 0,91

IM: Indice mitotique; IP : Indices prophase; Im : Indices de métaphase; IA : Indices d'anaphase, IT: Indices de télophase; Ext meth : Extrait méthanolique; ES : Erreur standard.

L'étude statistique type ANOVA a révélé une différence hautement significative entre les valeurs des indices de phases des extraits méthanoliques des feuilles de *P.harmala*, témoin négatif et les deux standards (colchicine et quercetine) (P= 0,00). Ce qui démontre un effet cytotoxique de nos extraits à différentes concentrations (1, 4,10 et 16 mg/ml) ainsi que la colchicine et la quercetine (1 mg/ml), au niveau des quatre phases à savoir : prophase, métaphase, anaphase, télophase.

Les comparaisons multiples des moyennes (Test Newman Keuls) ont révélé la formation de 6 groupes :A,B,BC,CD,D,E (Tableau XI :1) pour l'indice de prophase, et un seul groupe A pour celui de la métaphase, l'anaphase et télophase (Tableau XI :2 ;3 ;4).

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau XI : Les résultats de l'analyse des variances du type ANOVA pour les indices de phases (IPp, IPm, IPa, IPt).

1)	Groupe	Moyenne	2)	Groupe	Moyenne
Niveau Ext meth 16	A	1,14	Niveau Ext meth 1	A	0,00
Niveau Ext meth 10	B	12,51	Niveau COL	A	0,00
Niveau Ext meth 4	BC	20,28	Niveau Ext meth 10	A	0,00
Niveau Ext meth 1	CD	26,85	Niveau Ext meth 16	A	0,00
Niveau COL	D	32,05	Niveau QUE	A	0,00
Niveau QUE	E	40,57	Niveau Ext meth 4	A	0,00
Niveau T-		59,60	Niveau T-		1,43

3)	Groupe	Moyenne	4)	Groupe	Moyenne
Niveau COL	A	0,00	Niveau Ext meth 16	A	0,11
Niveau Ext meth 10	A	0,00	Niveau Ext meth 10	A	1,60
Niveau Ext meth 16	A	0,00	Niveau COL	A	1,83
Niveau QUE	A	0,00	Niveau QUE	A	3,26
Niveau Ext meth 4	A	0,00	Niveau Ext meth 1	A	9,03
Niveau Ext meth 1	A	0,06	Niveau Ext meth 4	A	9,48
Niveau T-		2,06	Niveau T-		24,57

1) : indice de phase de la prophase(IPp) ; 2) : indice de phase de la métaphase(IPm) ;
 3) : indice de phase de l'anaphase(IPa) ; 4) : indice de phase de la télophase(IPt).

L'augmentation du taux de prophase a été observée par AMATO (1949), sous l'influence de l'antipyrine où l'effet se traduit par une disparition progressive des métaphases, anaphase et télophase avec une augmentation relative du nombre de prophase qui, finalement restent seules puis disparaissent peu à peu par retour à l'état interphasique.

Ce phénomène doit probablement reliée à une intense altération de microtubules en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade métaphase Certains composés naturels comme certains saponines et flavonoïdes pourraient entrainer une disparition progressive des métaphases, des anaphases et des télophases avec une augmentation relative du nombre de prophases qui disparaissent ensuite peu à peu par retour à l'état interphasique (FUSCONI *et al.*, 2006). Selon ROGER (2007) l'extrait végétal pourraient provoquer soit un ralentissement des cellules d'entrer en autres stades de mitose notamment en métaphase, soit une altération des microtubules en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade ou bien même un blocage des cellules en prophase.

- **Indice des aberrations (IA)%**

L'observation des aberrations est un indicateur de toxicité sur le matériel génétique et la cellule, ces aberrations peuvent conduire à des dommages cellulaires et compris l'apoptose.

PARTIE EXPERIMENTALE

Elles peuvent être dues au blocage de la synthèse de l'ADN ou à l'inhibition de la formation des fuseaux mitotiques (DIMITRY et ROMANOVSKY, 2013).

Les aberrations observées (Figure 24) lors du traitement des racines d'oignon avec les différentes concentrations des extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala* se diffèrent d'un extrait à un autre (Tableau XII), et le pourcentage augmente relativement avec la concentration en extraits. Le maximum a atteint 57,90% à la concentration 16mg/ml et 11% à celle de 1mg/ml. Pour les témoins positifs, le taux d'anomalies rencontrées est élevé pour la colchicine (30,30%) par rapport à la quercétine (25,40%).

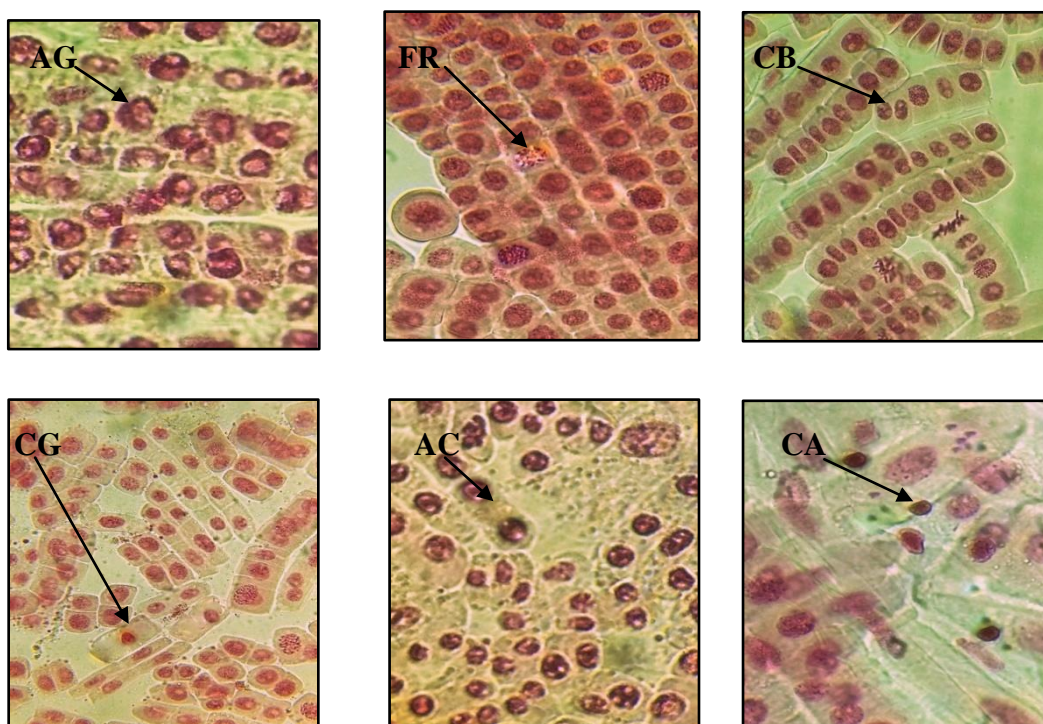


Figure 24 : Image de quelques anomalies observées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* (X400).

AG: Agglutination chromosomique ; **FR**: Fragmentation des chromosomes;
CB: Cellule binucléée ; **CG**: Cellule gégantèsque;
AC: Absence de cytotdièrese ; **CA**: Corps apoptotique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau XII: Les pourcentages des indices d'aberration obtenus.

Anomalies Extraits	AG ± ES (%)	CB± ES(%)	AL ± ES (%)	PC ± ES (%)	FR ± ES (%)	DP ± ES (%)	CG ± ES (%)	CS ± ES (%)	CA ± ES (%)	AC ± ES (%)	Total (%)
Colchicine (1mg/ml)	26,45 ±2,56	0,11 ± 0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	3,59±0,32	0,00±0,00	0,17±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	30,30
Quercetine (1mg/ml)	17,08±1,22	0,51±0,20	0,39±0,20	0,00±0,00	1,14±0,65	0,22±0,09	2,51±0,39	0,34±0,17	2,85±0,93	0,45±0,12	25,40
Ext. meth (16mg/ml)	49,53±1,69	0,17±0,10	1,42±0,22	0,00±0,00	0,22±0,09	0,00±0,00	2,10±0,32	0,85±0,29	0,28±0,1	3,36±0,43	57,90
Ext.meth (10mg/ml)	41,93±1,27	0,11±0,05	0,74±0,35	0,00±0,00	1,14±0,27	0,22±0,09	1,36±0,24	1,36±0,31	2,73±0,60	3,25±0,26	52,80
Ext. meth (4mg/ml)	20,68±1,66	0,51±0,27	1,19±0,20	0,00±0,00	0,74±0,11	0,34±0,09	0,51±0,23	0,28±0,12	0,45±0,17	2,68±0,43	27,30
Ext. meth (1mg/ml)	6,39±0,62	0,00±0,00	1,42±0,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,39±0,12	0,45±0,12	0,00±0,00	0,28±0,10	2,11±0,33	11,00

**FR : Fragmentation des chromosomes ; AG : Agglutination de chromosomes ; CG : Cellules gigantesques ;
 CB : Cellules binucléés ; AL : Allongement des cellules ; AC : Absence de cytotdiérèse ;
 PC: Pont chromosomique ; CS : Cellules sans noyau ; CA: Corps apoptotique ;
 DP: Désorganisation de la plaque équatoriale; Ext meth : Extrait méthanolique ; ES : Erreur standards.**

KWAN *et al.*, (2012) ont confirmé que les aberrations chromosomiques sont dues aux effets des extraits d' *Euphorbia hirta* sur la formation des fuseaux mitotiques et par conséquent des troubles de la division cellulaire.

L'étude statistique type ANOVA a révélé aucune différence significative entre les moyennes d'indices d'aberrations des extraits méthanoliques des feuilles de *P.harmala*, et les deux standards (colchicine et quercetine) (P= 0,88). Ce qui démontre un effet cytotoxique de nos extraits à différentes concentrations (1, 4,10 et 16 mg/ml) ainsi que la colchicine et la quercetine (1 mg/ml).

Les comparaisons multiples des moyennes (Test Newman Keuls) ont révélé la formation d'un seul groupe. La moyenne des aberrations de l'extrait méthanolique des feuilles de *Peganum harmala* à la concentration 4mg/ml (2,74%) est classée entre la moyenne de la colchicine 1mg/ml (3,03%) et celle de la quercetine 1mg/ml (2,55%). De ce fait, l'extrait méthanolique à la concentration 4mg/ml, possède un effet toxique supérieur à celui de la quercetine (1 mg/ml), utilisée comme flavonoïde standard, et inférieur à celui de la colchicine 1mg/ml, utilisée comme alcaloïdes standard. On peut suggérer alors que nos extraits contiennent ces deux composés bioactifs.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les aberrations chromosomiques observées dans cette étude sont évidemment causés par les constituants chimiques présents dans les extraits méthanolique de feuilles de *Peganum harmala L.* puisque aucune aberration n'a été observée chez le témoin négatif.

La plupart de ces anomalies sont définie par la présence des agglutinations chromosomiques (AG) dont la moyenne est de $49,53 \pm 1,69\%$ à la concentration 16mg/ml en extrait méthanolique, elles présentent le taux relativement élevé par rapport aux autres anomalies dans tous les extraits (Tableau XII). Selon BASS *et al.*, (2000), Cette tendance à l'agglutination pourrait être le résultat d'une diminution de la viscosité transformant les molécules allongées en molécules globulaires. Elle est probablement causés par une liaison subchromatidique entre les chromosomes qui perdent la capacité de mouvement et deviennent incapable de parvenir à leur destination finale, elles pourraient aussi résulter de la dépolymérisation de l'ADN et de la dissolution des nucléoprotéines suite à un stress, il reflète un état toxique, de type est habituellement irréversible et qui mène probablement à une mort cellulaire.

En plus des agglutinations chromosomiques on a observé la présence d'autre anomalies qui sont (figure25) : les cellules binucléés(CB) ; fragmentation des chromosomes(FR) ; allongement des cellules(AL) ; cellules gigantesques(CG) ; cellules sans noyau(CS) ; désorganisation de la plaque équatoriale(DP), des corps apoptotiques (CA) et l'absence de cytotidière(AC).

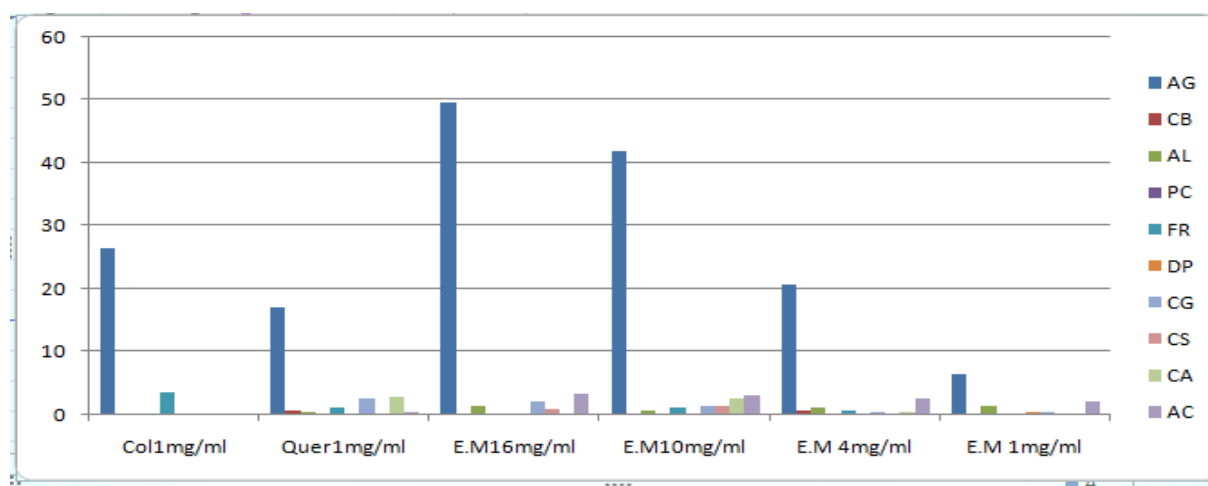


Figure 25 : Histogramme des aberrations observées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* (X400).

PARTIE EXPERIMENTALE

Par rapport aux cellules binucléées ($0,51\pm 0,20\%$) chez les cellules traitées par la quercétine et l'extrait méthanolique (4mg/ml), leurs présences laisse suggérer qu'elles sont dues probablement à l'éruption du processus de la cytokinèse à n'importe quel point de contrôle du cycle cellulaire, en agissant sur la formation du phragmoplaste, et empêchant la formation des cellules filles, conduisant à l'apparition de cellules polyploïdes (GRANT, 1976).

La présence des cellules binucléées est détectée dans toutes les concentrations testées (sauf la concentration 1mg/ml), elle est d'une moyenne de $0,51\pm 0,27\%$ chez les cellules traitées par la concentration méthanolique 4mg/ml . De même, les fragmentations des chromosomes, leurs présence est majoritaire chez les cellules traitées par la colchicine, avec une moyenne de $3,59\pm 0,32\%$. Selon MOREAU (2006), les fragmentations chromosomiques sont probablement dues à la nécrose. La nécrose est une mort cellulaire dite « accidentelle » qui survient lors d'un dommage tissulaire et elle implique des groupes de cellules. Les cellules sans noyaux sont également présent, avec un taux de $1,36\pm 0,31\%$ à la concentration 10mg/ml , leurs présence est nulle à la concentration 1mg/ml et suite au traitement par la colchicine. Selon ROGER (2007), elles sont le résultat d'une caryolyse. Celle-ci est définie comme une dissolution du noyau avec perte de ses affinités tinctoriales, elle s'accompagne de modifications des nucléo-protéines, avec dépolymérisation de l'ADN et hydrolyse sous l'effet d'enzymes cellulaires.

Les corps apoptotiques sont également présents, dont le taux à atteint $2,73\pm 0,6\%$ à la concentration 10mg/ml et $0,45\pm 0,17\%$ à la concentration 4mg/ml et en extrait méthanolique de feuilles de *Peganum harmala* et $0,28\pm 0,1\%$ pour les concentrations 16mg/ml et 1mg/ml .

D'après WYLLIE *et al.*, (1984), ils sont dues au clivage de la chromatine en fragments irréguliers ou bien au bourgeonnement de la membrane plasmique, les corps apoptotiques renferment une partie du cytoplasme de la cellule.

En ce qui concerne les cellules gigantesques, elles sont considérées comme une sorte d'adaptation aux stress abiotique, celle-ci peut être la conséquence d'endoréduplication, alors une polyploïdie. Il s'agit d'une alternative du cycle cellulaire classique où l'ADN est dupliqué sans division de la cellule, la mitose n'a pas lieu et le cycle cellulaire est réinitialisé (FASLA, 2009).

PARTIE EXPERIMENTALE

Les désorganisations de la plaque équatoriale quand à elles, leurs présence est avec un taux de $0,39 \pm 0,12\%$; $0,34 \pm 0,09\%$; $0,22 \pm 0,09\%$ respectivement pour les concentrations 1mg/ml ; 4mg/ml et 10mg/ml en extrait méthanolique de feuilles de *P.harmala* et sont absent à la concentration 16mg/ml. D'après ROGER (2007), les microtubules pourraient être la cible de certains flavonoïdes et triterpènes, leur action empêcherait la formation de la plaque cellulaire. Ce phénomène a été observé en utilisant l'extrait de fleurs de *Peganum harmala* et de feuilles *Lantana camara* (TURKUGLO, 2008).

Introduction générale

CONCLUSION GENERALE

Notre étude à révéler que les extraits méthanoliques des feuilles de *Peganum harmala* affectent la mitose et exerce un effet antimitotique sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Ceci se traduit par une diminution des indices mitotiques et des indices de phases par rapport aux cellules non traitées (témoin négatif) pour toutes les concentrations testées (16, 10, 4 et 1mg/ml). Les valeurs limites de toxicité diminuent en augmentant les concentrations en extrait. Les observations microscopiques ont révélées différents types d'anomalies à savoir : les agglutinations chromosomiques, les cellules binucléées, l'absence de cytodière et les fragmentations des chromosomes... Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés chez les cellules méristématiques traitées par la colchicine (1mg/ml) et la quercetine (1mg/ml). La concentration 1mg/ml de notre extrait a un effet meilleur que la quercetine traduisant ainsi son effet antimitotique.

Notre étude à démontrée la forte activité antimitotique de *Peganum harmala* . Cela mène à suggérer que cette espèce constitue une source prometteuses de substances anticancéreuses, ce qui permettra de renforcer la lutte de l'homme contre le cancer qui est majeur de santé publique.

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

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBASSI K., MERGAOUI L., ATAY Z., STAMBOULI A., GHAOUT S. (2003).** Effets des extraits de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775). *Zool. baetica*, **13(14)** , 203-217.
- ADHAMI H.R., FARSAM H. and KRENN L.(2011).** Screening of Medicinal Plants from Iranian Traditional Medicine for Acetylcholinesterase Inhibition. *Phytotherapy Research*, **25**,1148.
- AKINBORO A. and BAKARA A. (2007).** Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allim cepa*. *Journal of Ethnopharmacology*,**112(3)**,470-477.
- ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., ROBERTS K. et WOLTER L. (1997).**L'essentiel de biologie cellulaire : Introduction à la biologie moléculaire de la cellule. Médecine-Science , Flammarion, ed., pp 597.
- AMOS L.A. and BAKER T.S. (1979).** The three dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*, **279**, 607-612.
- ANDERSEN O.M. and MARKHAM K.R. (2006).** Flavonoids: chemistry biochemistry and application. *CRC Press, Boca Raton*, p1256.
- ANTONSIE-WICZ D. (1990).** Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of the Ledakrin. *Folia Histochemica and Cytobiologica*, **28**, 79-96.
- ASHTON A.Q. (2013).** Terpenes, advances in research and application. Scholarly, p 414.
- AVIGNON A., LAMBERT K. et BISBALC. (2010).** Thé, chocolat, raisin...on les polyphénols comme outils de prévention du diabète de type II. *Mise en point clinique d'endocrinologie*, 125-136.
- BAGHIANI A., DJARMOUNI M., BOUMERFEG S., TRABSA H., CHAREF N., KHENNOUF S. and ARRAR L. (2012).** Xanthine oxidase inhibition and antioxidant effects *Peganum harmala* L. seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, **1**, 42-56.
- BAMFORTH C.W. (1999).** Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **57(3)**, 81-90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BASS H.W., NAGAR S., HANLEY-BOWDOIN L. and ROBERSTON D. (2000).** Chromosome Condensation Induced by Geminivirus Infection of Mature Plant Cells. *Journal of Cell Science*, **113**, 1149-1155.
- BELLAKHDAR J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle, médecine arabe ancienne et savoir populaires. *Ibis press*, Paris, p 321.
- BENBOTT A., BAHRI L., BOUBENDIR R. and YAHIA A. (2013).** Study of the chemical components of *Peganum harmala* and evaluation of acute toxicity of alkaloids extracted in the Wistar albino mice. *J. MATER. ENVIRON. SCI*, **4 (4)**, 558-565.
- BOEIRA JM., DASILVA J., ERDTMANN B. and HENRIQUES JAP. (2001).** Genotoxic Effects of the Alkaloids Harman and Harmine Assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test in Mammalian Cells *in vitro*. *Pharmacology & Toxicology*. **89**,p 287.
- BOUROGAA E., JARRAYA RM., DAMAK M. and ELFEKI A. (2015).** Hepatoprotective activity of *Peganum harmala* against ethanol-induced liver damages in rats. *Arch Physiol Biochem*, **121(2)**, 62-7.
- BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. 4^{ème} ed, Paris. France.p 1288.
- BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation. 3^{ème} ed, Paris. France. 1120 p. 27.
- BUKHARI B., CHOI J.H., JEON C.W., PARK H.W., KIM W.H., KHAN M.A . and LEET S.H. (2008).** Phytochemical studies of the alkaloids from *Peganum harmala*. *Appl. Chem.*,**12**, 101–104.
- 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.
- CHEVREMONT M. (1979).** Cytologie et histologie. Maloine, ed., Paris. I. p 686.
- CHEVRET E. (2015).** Notions de Biologie Cellulaire, Biologie Moléculaire et Génétique. Thèse de doctorat.Université de Boreaux. pp 525.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

D'AMATO F. (1954). Action des facteurs physiques et chimiques sur la mitose. *Int. Botanique*, **9**, 1- 9.

DARABPOUR E., POSHTKOUHIAN BAVI A., MOTAMEDI H. and SEYYED NEJAD S.M. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *Excl. J.*, **10**, 252-263.

DMITRY S., PESNYA A., and ROMANOVSKY V.(2013). Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. *Mutation Research* **750**, 27– 33.

DOLISI G. (2009). La mitose. Georges Dolisi, (chapitre 3). P 15-26.

EDEAS M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, **5(5)**, 264- 270

EL-GHAMERY A.A., EL- KHOLY M.A. and YOUSSEF A. (2003). Evaluation of cytological effect of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research*, **537 (1)**, 29-41.

FAROUK L., LAROUBI A., ABOUFATIMA R., BENHARREF A. and CHAIT A. (2009). Study on antinociceptive activity of different extracts of *Peganum harmala* L. and possible mechanism of action. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, **8**, 29-35.

FASLA B. (2009). Evaluation du potentiel antimittotique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse Magister, Université d'Oran Es-sénia. Algérie, p 46-59.

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.

GALAS S., DESCAMPS S. et MARTINEZ A.M. (2008). Le cycle cellulaire. ed : De Boeck, paris. pp 115.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GLINSKA S., BARTEZAK M., OLEKSIK S., WOLSKA A., GABARA B., POSMYK M. et JANAS K. (2007).** Effects of anthocyanine on meristematic cells of *Allium cepa*. *Ecotoxicology and environmental safety*. **68**, 343-350.
- GRANT W.F. (1976).** Chromosome aberrations in plant as monitoring system. *Environ. Health Perspect.*, **27**, 37-43.
- GUIGNARD J.L. (1996)-** Biochimie végétale. ed. Masson, Paris. France. p 274.
- GURTI-FAKIM A.(2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**,1-93.
- HADDOUCHI F., LAZOUNI H.A., MEZIANE A. et BENMANSOUR A. (2009).** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Tymus fontanesi* Bioss and Reut. *Afrique science* ,**5**(2), 246-259.
- IKEDA K., PANT B., MISHIRO A., OZAWA K., MASUJINA T. and SUGIYANA M. (2000).** A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Jornal of bioscience and bioengineering*. **90** (5), 574-576.
- JAHIER J. (1992).** Techniques de cytogénétique végétale. INRA, ed., Paris. pp 181.
- JINOUS A. and FERESHTEH R. (2012).** Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afr J Pharm Pharmacol*. **6**, 1573-1580.
- KARP G. (1998).** Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts et expériences. De Boeck université, ed., Bruxelles. pp 665.
- LALAOUI K., MZIBRI L., LAGET M., GUIRAUD-DAURIAC H., DUMENIL G. et HMAMOUCHE H. (2004).** Effet antiprolifératif des Plantes Médicinales sur une Lignée Cancéreuse du Col de l'Utérus. *Maroc Médical*, **26**(2), 90-94.
- MACHEIX J. J., FLEURIET A., et JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR Presses polytechniques*.
- MAILLET M. (2002).** Biologie cellulaire. Masson, ed., paris. pp 257.
- MAILLET M. et LEMULLOIS M. (2006).** Biologie cellulaire. Masson, ed., paris. pp 618.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MARCANO L., CARRUYO I., FERNÁNDEZ Y., MONTIEL X., and TORREALBA Z. (2006). Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. *Biocell.*, **30**, 259–267.

MARS BRIGITTE. (2009). The Desktop Guide to Herbal Medicine. Publisher *Read How You Want*, p 492.

MEIJER L. (2003). Le cycle de la division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, **5**, 311-326.

MOKKADEM A. (1999). Cause de Dégradation des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. *Vie et Nature*, **7**, 24–26.

MOREAU D. (2006). Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse Doc. Université de Nantes. France. pp 321.

NENAAH G. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* L. seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, **81**,779-782.

OUZID Y., SMAIL-SAADOUN N. and HOUALI K. (2019). Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of *Peganum harmala* L. from dayate aiat (Laghouat, Algeria). *J. Fundam. Appl. Sci.*, **11(2)**, 587-604.

OZENDA P. (1958). Flore du Sahara septentrional et central. CNRS, éd., Paris .pp 486.

OZENDA P. (1977). Flore du Sahara. CNRS, p 322.

PARIS R. and DILLEMANN G.(1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue pharmacologique in *les plantes médicinales des régions arides*. UNESCO. pp 57.

PICKARD J.D., AKALAN N., DI ROCCOC., DOLENC VV., LOBO ANTUNES J., MOOIJ J.J.A., SCHRAMM J. and SINDOU M. (2009). Advances and technical standards in neurosurgery.Springer Science & Business Media, pp 209.

RĂCUCIU M. and CREANGĂ D.(2007). Cytogenetic changes induced bu aqueous ferrofluids in agricultural plants. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **311** , 288-290.

RAHIMI-MOGHADDAM P., EBRAHIMI S.A., OURMAZDI H., SELSELEH M., KARJALIAN M., HAJ-HASSANI G., ALIMOHAMMADIAN M.H., MAHMOUDIAN M. and SHAFIEI M. (2011). *In vitro* and *in vivo* activities of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Peganum harmala L. extract against *Leishmania major*. *J Res Med Sci*, **16(8)**, 1032-1039.

Richter G. (1993). Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. pp 317-339.

ROGER P. (2007). Séméiologie anatomo-cinique des lésions vasculaires et circulatoires : Anatomie pathologique. A5- *Lésions vasculaires et circulatoires*. Faculté de médecine Montpellier-Nimes. France.

SCHWEITZER-STENNER R. UVERSKY V.(2012). Peptide Folding, Misfolding, and Nonfolding.Hoboken. John Wiley and Sons, p 500.

SHARKEY T.D.H.E. (1991). Stomatal control of trace gas emissions. Trace gas emission dy plants. Physiological ecology. A series of monographs, texts, and treatises. Ed. Ca, *Academic press, San diego*. USA. pp 335-339.

SHWETA. S, KHADABADI. S and GANESH. T.G. (2012). *In vitro* antimitotic, antiproliferative,DNA fragmentation and anticanceractivity of *chloroform and ethanolextract of Reviahypocrateriformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S 503-S506 .

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.

TURKUGLO S.(2008). Molecular Controls of Growth Arrest and Apoptosis: Dependent and Independent Pathways. *Oncogene*, **11**, 199-200.

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

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

WYLLIE A.H., SMITH A.L. and DUNLOP D.(1984). Chromosome cleavagein apoptosis association with condensed chromatin morphology and dependce on macromolecular synthesis, *Journal of Pathology*. **142**, 67-77.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liens internet:

ALLAIN P. (2005). Les médicaments. <http://www.pharmacorama.com/lelivre.php>

HAMMICHE V. et MERAD R. (1990). *Peganum harmala*. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph 402.Plant. Disponible sur le site: http://www.inchem.org/documents/pims/plant/pim_402.fr.htm.

HAMMICHE V. et MERAD R. (1997). *Peganum harmala* L. (PIM 402F, French) – ipcs inchem, disponible (URL) en :<http://www.inchem.org/documents/pims/plant/pim402fr.htm>

LAVERGNE. (2013). Zygophyllacées. Disponible en format (URL) sur Internet. <http://www.universalis.fr/encyclopedie/zygophyllacees>.

<https://www.google.dz/maps/place/Laghouat>.

Annexes

Annexes

Annexe 1

Le matériel de laboratoire utilisé

Type	Matériel
Verrerie	Flacons, béchers, boîtes de pétri, lames et lamelles, verres de montre, pipettes.
Appareillage	Balance, centrifugeuse, agitateurs magnétique, vortex, appareil photo, micropipettes électroniques
Autres	Embouts stériles, ciseau, pinces, lames à bistouri, papier aluminium, micropipettes.

Annexe 2

Les indices de phases obtenus comparés au témoin.

Indices Extraits	IM ± ES (%)	IP ± ES (%)	Im ± ES (%)	IA ± ES (%)	IT ± ES (%)
Témoin (-)	87,74 ± 1,37	59,60 ± 3,38	1,42 ± 0,39	2,05 ± 0,56	24,57 ± 4,83
Colchicine (1mg/ml)	33,88 ± 1,70	32,05 ± 1,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,82 ± 0,40
Quercetine (1mg/ml)	43,88 ± 0,46	40,57 ± 0,90	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,26 ± 1,07
Ext. meth (16mg/ml)	1,25 ± 0,20	1,13 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,10
Ext. meth (10mg/ml)	14,11 ± 0,32	12,51 ± 0,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,60 ± 0,33
Ext .meth (4mg/ml)	29,76 ± 0,50	20,28 ± 0,84	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,48 ± 0,54
Ext. meth (1mg/ml)	35,93 ± 0,62	26,85 ± 0,99	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,04	9,02 ± 0,91

IM: Indice mitotique; IP : Indices prophase; Im : Indices de métaphase; IA : Indices d'anaphase, IT: Indices de télophase; Ext meth : Extrait méthanolique; ES : Erreur standard.

;

Annexes

Annexe 3

Résultats de l'étude statistique.

A) Indice mitotique (IM)

	Ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	6,00	22323,20	3720,53	714,94	0,00
Var.résiduelle	28,00	145,71	5,20		
Total	34,00	22468,91			

B) Valeur limite de cytotoxicité (VLC)

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	5,00	8094,39	1618,88	304,77	0,00
Var.résiduelle	24,00	127,48	5,31		
Total	29,00	8221,88			

C) Indice de prophase (IP)

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	6,00	10970,69	1828,45	121,73	0,00
Var.résiduelle	28,00	420,56	15,02		
Total	34,00	11391,26			

D) Indice de métaphase (Im)

	Ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	6,00	8,74	1,46	10,37	0,00
Var.résiduelle	28,00	3,93	0,14		
Total	34,00	12,67			

E) Indice d'anaphase (IA)

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	6,00	17,97	2,99	10,32	0,00
Var.résiduelle	28,00	8,13	0,29		
Total	34,00	26,09			

Annexes

F) Indice de télophase (IT)

	Ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	6,00	2181,70	363,62	15,53	0,00
Var.résiduelle	28,00	655,73	23,42		
Total	34,00	2837,43			

G) Indice d'aberration (IA)

	Ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	5,00	158,44	31,69	0,35	0,88
Var.résiduelle	54,00	4900,93	90,76		
Total	59,00	5059,36			