

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**



UNIVERSITE MOULOU MAMMERI 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 sciences biologiques
Option : Biochimie Appliquée**

Thème

**Effet antimitotique et cytotoxique des flavonoïdes
des feuilles de *Verbascum sinuatum* L.**

Présenté par :

M^{elle} DAHMANI Messilva et M^{me} BOUAZIZ-MENOUER Tassadit

Soutenu le : 14 juillet 2019

Devant le jury composé de :

HOUALI Karim	Professeur	UMMTO	Président
AICHE-IRATNI Ghenima	Maitre de conférence B	UMMTO	Promotrice
OUZID Yasmina	Docteur	UMMTO	Co-promotrice
BARIZ Karim	Maitre assistant A	UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2018/2019



Remerciement

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre gratitude.

Dans un premier temps, nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance à Mr. HOUALI K., professeur en microbiologie à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire, de nous avoir fais découvrir ce sujet et d'avoir pu bénéficier de ses qualités pédagogiques.

Nous tenons également remercier M^{me} IRATNI GHNIMA, maitre de conférence à l'UMMTO qui nous a guidées durant la réalisation de ce travail, d'avoir pu bénéficier de ses précieux conseils et d'avoir acceptée de présider le jury.

Nous désirons aussi exprimé toute notre gratitude à Dr OUZID YASMINA, pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité à tout moment et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous tenons également à remercier Mr BARIZ KARIM pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.

En guise de reconnaissance, nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin au bon déroulement de ce mémoire de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste travail.





Dédicace

Je dédie ce travail :

À mes parents, pour tous leurs sacrifices et leur soutien

inconditionnel ;

À mes grands parents.

Messilva





Je dédie ce travail

À mes chers parents ;

À mon mari ;

À mon fils Amayas.

Tassadit



PLAN

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Summary

Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : <i>Verbascum sinuatum</i> L.	2
1.1. Description botanique	2
1.2. Métabolites secondaire de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	3
1.2.1. Les polyphénols	3
1.2.1.1. Les flavonoïdes	4
1.2.2. Les composés terpéniques	4
1.2.2.1. Les saponines	4
1.2.2.2. Les iridoïdes	5
1.2.3. Les alcaloïdes	5
Chapitre II : Le cycle cellulaire	7
2.1. Les différentes phases du cycle cellulaire	8
2.1.1. L'interphase	8
2.1.2. La mitose	9
2.1.2.1. La prophase	9
2.1.2.2. La prométaphase	9
2.1.2.3. La métaphase	9
2.1.2.4. L'anaphase	9
2.1.2.5. La télophase	10
Chapitre III: Activités biologiques des métabolites secondaires	10
3.1. Les antimitotiques d'origine végétale	10
3.1.1. Les inhibiteurs d'assemblage de la tubuline	12
3.1.1.1. La colchicine	12

3.1.1.2. Les vinca-alkaloïdes	13
3.1.2. Les inhibiteurs de désassemblage des microtubules	13
3.1.2.1. Les taxoïdes	13
3.1.3. Les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes	14
3.1.3.1. La quercétine	14
3.2. L'effet sur la membrane érythrocytaire	15
3.2.1. L'érythrocyte	15
3.2.2. L'hémolyse	16
3.2.3. Effet des polyphénols sur la stabilité membranaire	16
3.2.4. Effet des saponines sur la membrane érythrocytaire	17
Partie expérimentale	
1. Matériel et méthodes	19
1.1. Matériel	19
1.1.1. Matériel biologique	19
1.1.2. Réactifs et solvants	19
1.1.3. Matériel de laboratoire	19
1.2. Méthodes	20
1.2.1. Préparation du matériel végétal	20
1.2.2. Extraction des fractions flavonoïques	20
1.2.3. Dosage des fractions flavonoïques	22
1.2.4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antimittotique	22
1.2.5. Évaluation <i>in vitro</i> de l'action des fractions sur la membrane érythrocytaire	25
1.2.6. Etude statistiques	26
2. Résultats et discussions	27
2.1. Composition des fractions flavonoïques	27
2.2. Evaluation de l'effet antimittotique	28
2.2.1. Détermination des différents indices	28
2.2.2. Principales anomalies de la division cellulaire	31
2.2.3. Illustration des principales aberrations	32
2.2.4. La valeur limite de cytotoxicité	36
2.3. Evaluation de l'effet des fractions flavonoïques sur la membrane érythrocytaire	38
Conclusion	40

Références bibliographiques	41
Annexes	

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
V	<i>Verbascum</i>
MSA	Microtubule Stabilizing Agent
GDP	Guanosine Di Phosphate
GTP	Guanosine Tri Phosphate
ATP	Adénosine Tri Phosphate
ATPase	Adénosine Tri phosphatase
ATPase Ca ²⁺ -Mg ²⁺	Adénosine Tri Phosphatase calcium – magnésium
Na ⁺ -K ⁺ ATPase	Adénosine Tri Phosphatase sodium – potassium
AMPC	Adénosine Monophosphate Cyclique
GMP	Guanosine Mono Phosphatase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
SM	Spectroscopie de masse
RMN	Résonance magnétique nucléaire

Liste des figures

N°	Intitulé de la figure	Page
1	Vue d'ensemble de la plante <i>Verbascum sinutum</i> L.	3
2	Structures des principaux flavonoïdes isolés dans le genre <i>Verbascum</i>	4
3	Constituants terpéniques majeurs du genre <i>Verbascum sinuatum</i> L.	5
4	Structure de deux alcaloïdes isolés chez le genre <i>Verbascum</i>	6
5	Les différentes étapes du cycle cellulaire	8
6	Les différentes étapes de la mitose	10
7	Structure des microtubules	11
8	Structure et domaine de liaison de la colchicine sur la tubuline	12
9	Structure et domaine de liaison de la vinblastine sur la tubuline	13
10	Structure et domaine de liaison du paclitaxel sur la tubuline	14
11	Mécanisme d'action des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes	15
12	Image de globules rouges humains	16
13	Inhibition de l'ATPase membranaire par les flavonoïdes	17
14	Modèles schématiques des mécanismes moléculaires de l'activité de la saponine vis-à-vis des membranes	18
15	Extraction des fractions flavonoïques	21
16	Principales étapes de l'évaluation de l'activité antimitotique	24
17	Préparation de la suspension et évaluation de l'activité sur la membrane érythrocytaire	26
18	Courbe d'étalonnage de la quercétine	27
19	Les différentes phases de la mitose vues sous microscope optique (X 40)	32
20	Aberrations chromosomiques observées sous microscope optique (X40) chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par la quercétine (témoin positif)	33
21	Aberrations chromosomiques vues sous microscope optique (X400) chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par la fraction butanolique des feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	34
22	Aberrations chromosomiques observées sous microscope optique (X 40) chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par la fraction aqueuse des feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	35

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
I	Activités biologiques des métabolites secondaires isolés dans le genre <i>Verbascum</i>	7
II	Réactifs et solvants utilisés	19
III	Indices mitotiques et indices de phases des différentes fractions étudiées	29
IV	Indices d'aberrations des différents extraits flavonoïques	31
V	Valeurs limites de cytotoxicité	36
VI	Pourcentage d'hémolyse des extraits flavonoïques	38

Résumé

Les plantes médicinales sont une source très importante de métabolites bioactifs naturels à l'origine de plusieurs activités biologiques, à savoir antioxydante, antiproliférative, anti-inflammatoire, hémolytique, antimototique... C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressées à une plante du bassin méditerranéen très utilisée en médecine traditionnelle : *Verbascum sinuatum* L. La présente étude vise à quantifier la teneur en flavonoïdes et à évaluer les effets antimototiques des deux fractions aqueuse et butanolique des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. (Scrophulariaceae) sur les cellules méristématiques, en utilisant le test *Allium cepa* et à déterminer l'impact de ces fractions sur l'intégrité membranaire par le test d'hémolyse. Après une extraction avec différents solvants à polarité variable, les teneurs des flavonoïdes estimés par dosage colorimétrique sont de $95,43 \pm 0,01$ μg EQ/ml de fraction et $97,70 \pm 0,02$ μg EQ/ml de fraction, respectivement pour la fraction butanolique et aqueuse. Les résultats obtenus indiquent que la fraction butanolique et la fraction aqueuse inhibent la mitose par diminution des indices mitotiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* ($47,20 \pm 1,03\%$ pour la fraction butanolique et $70,00 \pm 0,75\%$ pour la fraction aqueuse) comparativement au témoin négatif ($92,20 \pm 1,34\%$). Ainsi, nous avons constaté que l'indice de phase est représenté majoritairement par des prophases et que la fraction butanolique engendre le plus d'aberrations avec un total de $26,51 \pm 8,06\%$. Nous avons aussi déterminé la valeur limite de cytotoxicité. Celle de la fraction butanolique qui est de $51,19 \pm 1,29\%$ confirme que cette dernière est sublétales. Quant au résultat du pourcentage d'hémolyse, il est de $87,84 \pm 0,00\%$ ce qui indique que ces fractions induisent également un effet hémolytique sur la membrane érythrocytaire dû à l'action des flavonoïdes qu'elles contiennent. Cela justifie certaines des propriétés médicinales de cette plante ainsi que son utilisation dans le traitement contre le cancer.

Mots clés: *Verbascum sinuatum* L., fractions flavonoïques, effet antimototique, *Allium cepa*, effet cytotoxique.

Summary

Medicinal plants are a very important source of natural bioactive metabolites that are the source of several biological activities, such as antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory, hemolytic, antimitotic ... It is in this perspective that we are interested in a plant of Mediterranean basin widely used in traditional medicine: *Verbascum sinuatum* L. The present study aims to quantify the flavonoid content and to evaluate the antimitotic effects of the aqueous and butanolic fractions of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. (Scrophulariaceae) on the meristematic cells using the *Allium cepa* test and determined the impact of these fractions on membrane integrity by the haemolysis test. After extraction with various solvents with variable polarity, the flavonoid contents estimated by colorimetric assay are $95.43 \pm 0.01 \mu\text{g EQ} / \text{ml}$ and $97.70 \pm 0.02 \mu\text{g EQ} / \text{ml}$ of fraction, respectively for the butanolic fraction and aqueous. The results obtained indicate that the butanolic and aqueous fractions inhibit mitosis by decreasing the mitotic indices of the meristematic cells of *Allium cepa* ($47.20 \pm 1.03\%$ for the butanolic fraction and $70.00 \pm 0.75\%$ for the aqueous fraction). compared to the negative control ($92.20 \pm 1.34\%$). so, we found that the phase index is represented mainly by prophases and that the butanolic fraction generates the most aberrations with a total of $26.51 \pm 8.06\%$. We also determined the limit value of cytotoxicity. That of the butanolic fraction, which is $51.19 \pm 1.29\%$, confirms that the latter is sublethal. When the result of the percentage of hemolysis, it is $87.84 \pm 0.00\%$ which indicates that these fractions also induce a haemolytic effect on the erythrocyte membrane due to the action of flavonoids they contain. This justifies some of the medicinal properties of this plant as well as its use in the treatment against cancer.

Key words: *Verbascum sinuatum* L., flavonoid fractions, antimitotic effect, *Allium cepa*, cytotoxic effect.

Introduction

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).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2006), le cancer représente une cause majeure de décès dans le monde, plus que le nombre de décès causés par le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme réunis. Dans les pays industrialisés, le cancer constitue la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Néanmoins, différents types de traitements sont possibles comme la chimiothérapie. Malheureusement le coût de cette thérapie est très onéreux. De plus, elle présente de nombreux effets indésirables du fait de son mécanisme d'action peu sélectif. Ce qui doit motiver la recherche et le développement de nouvelles molécules afin de proposer des thérapies beaucoup plus spécifiques des maladies cancéreuses (OMS, 2006).

A ce sujet, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale Algérienne : *Verbascum sinuatum* L. appartenant à la famille des Scrophulariacées pour ces nombreux effets et vertus thérapeutiques. Cette plante représente une mine de composés bioactifs très intéressants (ZHANG et WANG, 2008). Cependant les flavonoïdes font partie des métabolites secondaires les plus étudiés en raison de leur utilisation particulièrement dans les domaines pharmaceutiques pour leurs effets bénéfiques pour la santé (AVIGNON *et al.*, 2010). Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées au vieillissement dont le cancer (HENNEBELLE *et al.*, 2004).

Notre travail est basé sur l'extraction et la détermination de la teneur en flavonoïdes de la fraction aqueuse et butanolique des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. Nous avons jugé intéressant d'évaluer l'effet antimitotique de ces extraits sur les cellules méristématiques des racines de bulbes d'oignons (*Allium cepa*), ainsi que leur effet sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire humaine.

Partie bibliographique

Partie bibliographique

Chapitre I : *Verbascum sinuatum* L.

Verbascum sinuatum L. appelé aussi molène à feuilles sinuées ou molène ondulé, est une plante méditerranéenne très commune dans le Tell Algérien (REMAL, 2014). Elle est employée en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus thérapeutiques (TATLI et AKDEMIR, 2006 ; DEMNATI et ALLACHE, 2014). Elle se développe dans les champs et les pelouses, sur les terres en friche, au bord des chemins, dans les jardins et sur les sols arides (SPERANZA *et al.*, 2010).

La classification systématique de cette espèce est résumée ci-dessous (STOODER, 2015).

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

1.1. Description botanique

Verbascum sinuatum L. est une plante herbacée bisannuelle qui appartient à la famille des Scrophulariacées (REMAL, 2014), connue sous le nom de Bou cira et Mouçaleh el andar (DJERROUMI et NACEF, 2016). Le terme « *Verbascum* » vient de *Barbascum* et signifie barbu en référence au fait que la plante est couverte d'un duvet cotonneux et que les étamines soit barbues (ALIPIEVA *et al.*, 2014). « *Sinuatum* » décrit les feuilles de la rosette qui sont dentées et ondulées (REMAL, 2014). Les fleurs de couleur jaune, sont groupées par 2 à 5 en glomérules espacés, elles sont solitaires, apicales avec un pédoncule court. Les 5 étamines sont munies au sommet de poils violets qui colorent le centre de la fleur (Figure 1). La floraison se fait en Mai et en Août (DANE et YILMAZ, 2009 ; REMAL, 2014).

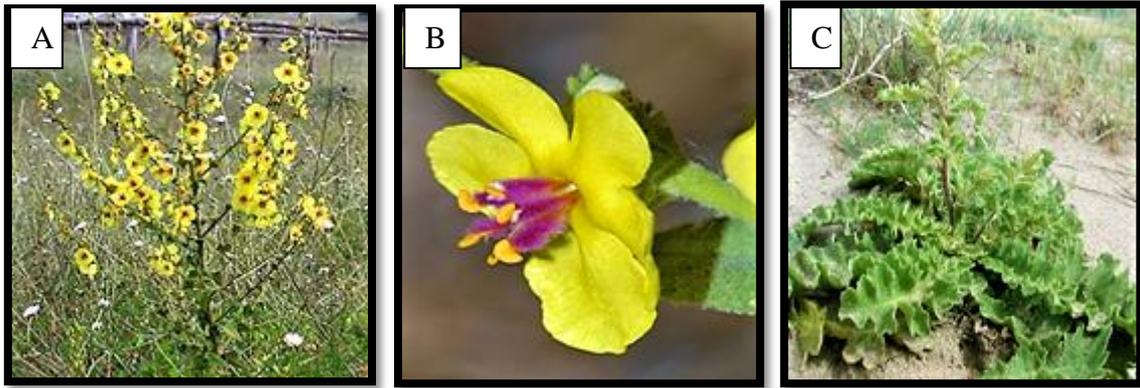


Figure 1: Vue d'ensemble de la plante *Verbascum sinuatum* L. (DANE et YILMAZ, 2009 ; JARADAT *et al.*, 2015).

A : Tige et fleurs **B:** Fleurs **C:** Feuilles

1.2. Métabolites secondaires de *Verbascum sinuatum* L.

Les métabolites primaires sont constitués de protéines, glucides et lipides, ce sont des composés universels qui participent aux fonctions cellulaires (KRIEF, 2004). Par opposition aux métabolites secondaires qui sont des composés qui diffèrent d'une espèce à une autre. Ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec tout ce qui l'entour, notamment pour faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit (prédateurs et microorganismes pathogènes) (KANSOLE, 2009). Ces multiples relations ont engendré une diversification des métabolites secondaires. À ce sujet *Verbascum sinuatum* L. a été largement étudiée. Ces études ont démontré que cette espèce contient une large gamme de différents métabolites secondaires (DRANDAROV et HAIS, 1997). Ces derniers sont classés en trois groupes principaux : les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (MACHEIX *et al.*, 2005 ; VERMERRIS et NICHOLSON, 2006).

1.2.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont une vaste famille regroupant plus de 8000 composés non azotés présentant des cycles aromatiques, le plus souvent solubles dans l'eau et sous forme glycoconjugués. Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques : celle de l'acide shikimique, et celle issue de l'acétate (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002). Les polyphénols sont divisés en plusieurs catégories selon la base d'éléments structuraux, à savoir les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines, les tannins et les flavonoïdes (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002 ; MACHEIX *et al.*, 2005).

Partie bibliographique

1.2.1.1. Les flavonoïdes

Ce sont des pigments naturels hydrosolubles, qui se retrouvent souvent sous forme d'hétérosides, mais on peut les retrouver non liés à une partie glucidique dans ce cas ils sont dits « aglycones ou génines ». A ce jour de nombreux flavonoïdes ont été détectés chez les différentes espèces de *Verbascum* (TATLI et AKDEMIR, 2004), d'où la grande variété de flavones et flavonols comme l'apigénine, la lutéoline, la quercétine et kaempférol (ALIPIEVA *et al.*, 2014). En plus de ces composés, les feuilles et les graines de *V. sinuatum* sont riches en flavonoïdes glycosylés comme la lutéoline 7-O-D glucoside, l'acacétine 7-O-D-glucoside, et la rutine (SENATORE *et al.*, 2007 ; DANCHUL *et al.*, 2007) (Figure 2).

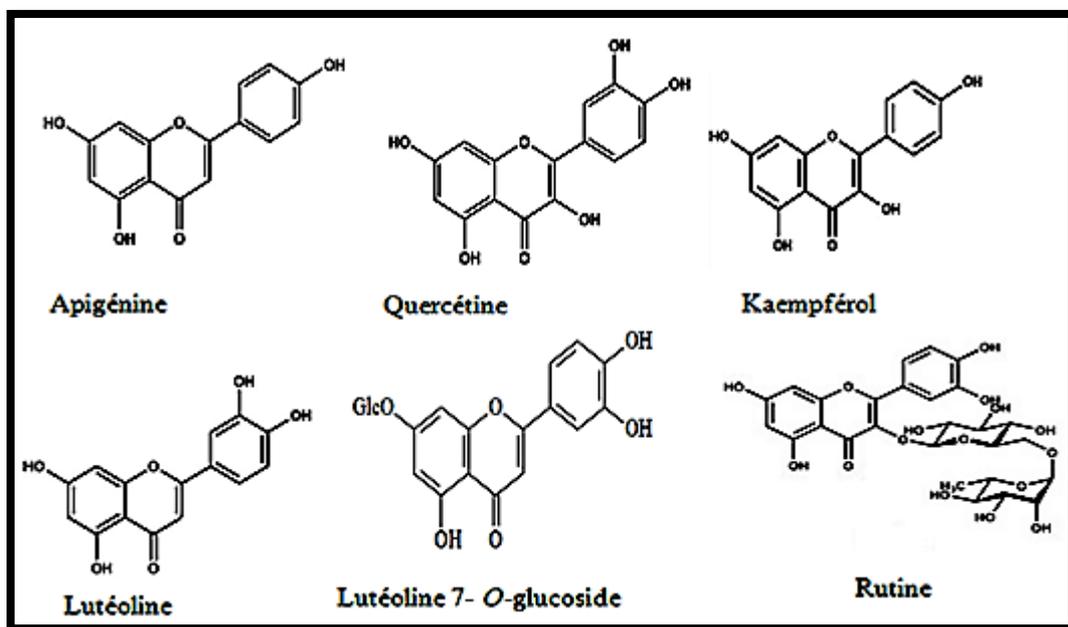


Figure 2 : Structures des principaux flavonoïdes isolés dans le genre *Verbascum* (SENATORE *et al.*, 2007 ; ALIPIEVA *et al.*, 2014).

1.2.2. Les composés terpéniques

Les terpénoïdes constituent la plus large classe des composés secondaires. Ils sont issus de la condensation d'unités d'isoprènes à 5 atomes de carbone (HERNANDEZ-OCHOA, 2005). Plusieurs investigations ont démontré que les composés terpéniques dont les iridoïdes et les saponides sont les principaux métabolites secondaires du genre *Verbascum* (BIANCO *et al.*, 1980).

1.2.2.1. Les saponines

Les saponosides tri terpéniques sont des composants majoritaires des plantes Scrophulariacées en général et le genre *Verbascum* en particulier (XU *et al.*, 2004). Ce sont

Partie bibliographique

des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe très diversifié de molécules tri terpéniques ou stéroïdes (WALLACE, 2004). Des études phytochimiques portant sur les parties aériennes de *Verbascum sinuatum* L. ont abouti à l'isolement de quelques saponosides dont verbascosaponine (BRADLEY, 2006).

1.2.2.2. Les iridoïdes

Les iridoïdes sont des composés mono terpéniques caractérisés par un squelette cyclopenta pyranique nommé iridane. Ils ont une fonction énol-éther très caractéristique qui s'ouvre facilement s'il n'y a pas de sucre lié (EVAN, 2002). Plusieurs iridoïdes des plantes Scrophulariacées ont été isolés à partir des parties aériennes de *Verbascum sinuatum* dont l'harpagide et l'aucubine (BIANCO *et al.*, 1981). On retrouve également le verbascoside A, catalpol, phlomidoside, ajugol, sinuatol (BRADLEY, 2006). La figure 3 illustre les composés terpéniques les plus retrouvés chez *Verbascum sinuatum* L.

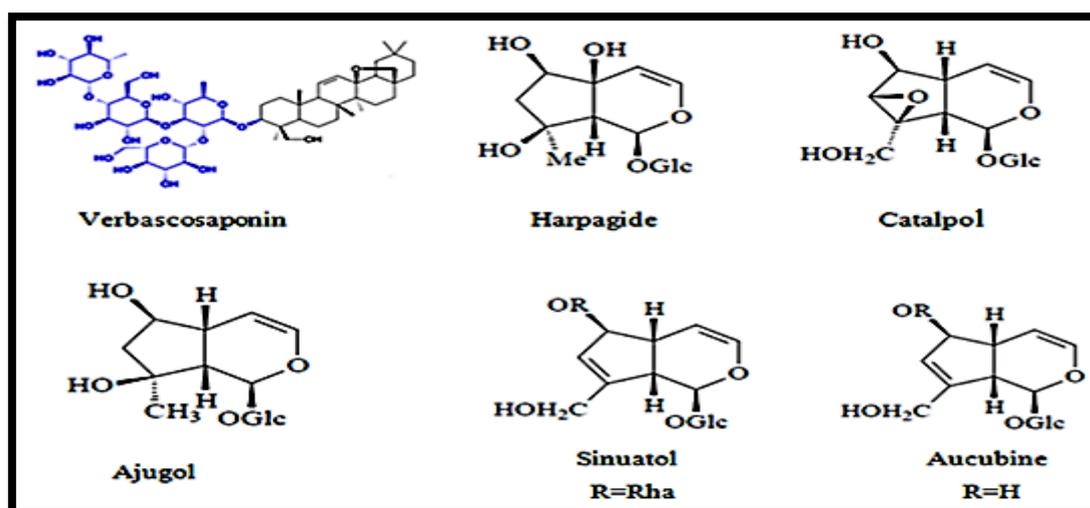


Figure 3 : Constituants terpéniques majeurs du genre *Verbascum sinuatum* (BRADLEY, 2006).

1.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés basiques très peu volatils, de structure complexe et cyclique. Ils se retrouvent essentiellement chez les Angiospermes dans toutes les parties de la plante (EDZIRI *et al.*, 2010 ; PATEL *et al.*, 2013). Ils existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins (ZIEGLER et FACCHINI, 2008). Les alcaloïdes sont insolubles ou fort peu solubles dans l'eau; ils sont solubles dans l'alcool plus à chaud qu'à froid, l'éther, les acides et dans

Partie bibliographique

l'ammoniaque (COWAN, 1999). Plusieurs alcaloïdes ont été isolés à partir des parties aériennes de *Verbascum*, parmi ces derniers on retrouve : verbacine, verbasitrine et verballoscénine (KOBALICOVA *et al.*, 1983) (Figure 4).

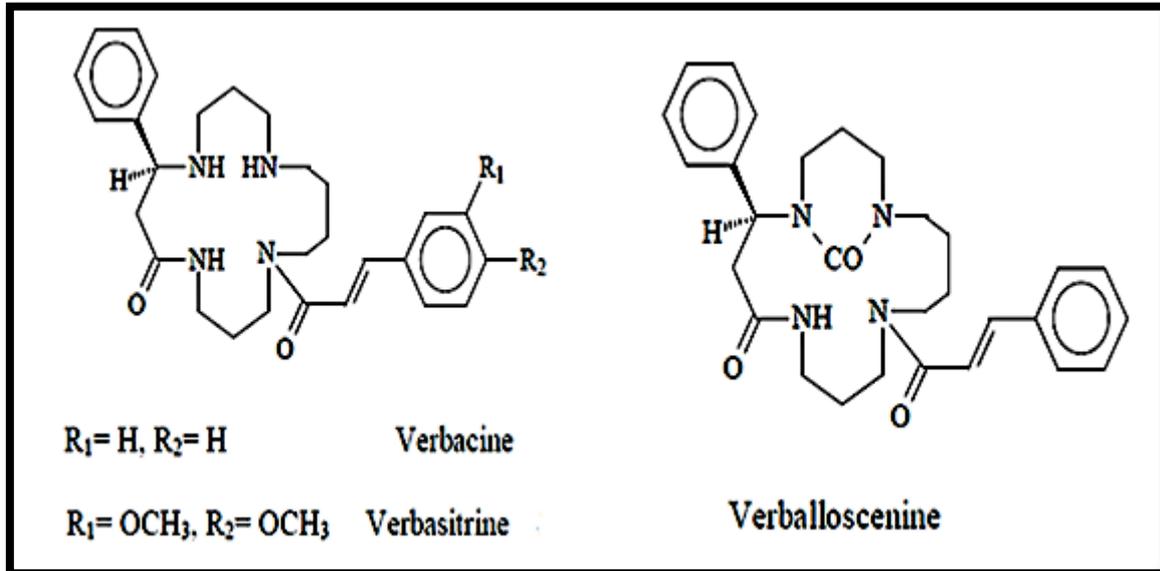


Figure 4 : Structure de trois alcaloïdes isolés chez le genre *Verbascum* (MUNIZ, 2006).

Les espèces du genre *Verbascum* possèdent diverses activités biologiques qui sont dues aux composés bioactifs qu'ils contiennent (ALIPIEVA *al.*, 2014). Certaines des meilleures propriétés thérapeutiques enregistrées chez les molènes, sont mentionnées dans le tableau I.

Partie bibliographique

Tableau I: Activités biologiques des métabolites secondaires isolés dans le genre *Verbascum*.

Les composés	Partie de la plante	Activité biologique	Référence bibliographique
Les saponines et les iridoïdes	Feuilles, racines et fleurs	Anti bactérienne, antiseptique, antispasmodique, analgésique, anticancéreuse et anti leishmanique	(SENATORE <i>et al.</i> , 2007) (TATLI et AKDEMIR, 2006) (ZHANG <i>et al.</i> , 2012) (KOZLOWSKA et SZOSTAK-WEGIEREK, 2014)
Flavonoïdes	Feuilles et fleurs	Anti-inflammatoire, antiallergique, hépato protecteur, diurétique, antivirale, anti- œdémateuse et vasoprotectrice	(BRUNETON, 1999)
Les alcaloïdes	La plante entière	Antihelminthique	(KOZAN <i>et al.</i> , 2011)
Acides phénoliques	Feuilles et fleurs	Neuroprotectrice	(TATLI <i>et al.</i> , 2015)

Chapitre II : Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est défini comme l'ensemble des étapes ayant lieu entre deux divisions cellulaires successives. C'est un processus fondamental et commun à toutes les cellules eucaryotes. Il est composé de deux grands événements : la réplication des chromosomes d'une part et la division de la cellule d'autre part (Figure 5) (HACHED *et al.*, 2011).

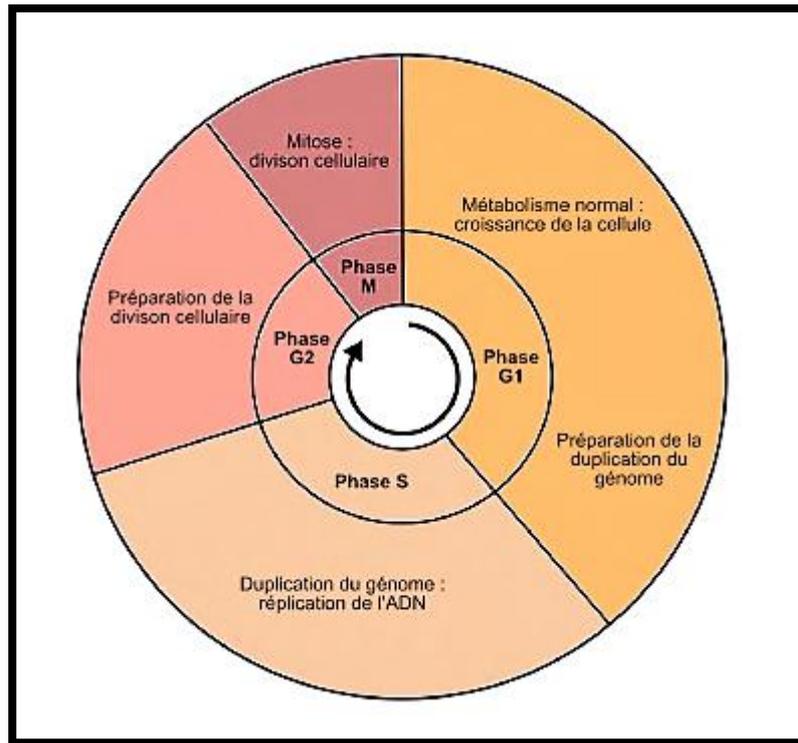


Figure 5 : Les différentes étapes du cycle cellulaire (CHEESMAN et DESAI, 2008).

2.1. Les différentes phases du cycle cellulaire

2.1.1. L'interphase

L'interphase comporte chez la plupart des cellules eucaryotes trois phases distinctes appelées G1, S, et G2. La première phase dite G1, (G pour Gap, "intervalle" en anglais) est une phase de croissance de la cellule, qui correspond à l'intervalle entre la division cellulaire précédente et la phase de synthèse de l'ADN (NORBURY et NURSE, 1992). En phase S (S pour "synthèse"), il s'agit de l'évènement central de la réplication de l'ADN. Cette synthèse commence au niveau des origines de réplication, dont l'accessibilité à la machinerie de réplication est finement régulée pour ne permettre qu'un seul tour de réplication (HANAOKA et SUGASAWA, 2016). A l'issue de la phase S, chaque chromosome dupliqué sera constitué de deux chromatides sœurs. Les centrosomes, structures autour desquelles s'organise le réseau de microtubules sont dupliqués en phase S. Lorsque la réplication de l'ADN est terminée, la cellule entre dans une nouvelle phase intermédiaire appelé G2, pendant laquelle la cellule vérifie l'intégrité de l'ADN génomique après réplication et prépare l'entrée en mitose (TANENBAUM et MEDEMA, 2010).

Partie bibliographique

2.1.2. La mitose

La division cellulaire ou mitose, est l'étape du cycle cellulaire au cours de laquelle les chromosomes sont visibles et ségrègent équitablement au sein de deux cellules filles (HERBERT *et al.*, 2015). Elle comporte les étapes suivantes :

2.1.2.1. La prophase

En prophase, la condensation des chromosomes est réalisée grâce aux condensines et aux histones (KALITSIS *et al.*, 2017). Le second évènement majeur de la prophase est la séparation des centres organisateurs des microtubules qui sont les centrosomes. A la fin de la prophase, le noyau disparaît lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, cette rupture marque généralement le début de l'entrée en mitose. Cet évènement permet de rendre accessible les chromosomes à la machinerie de séparation des chromosomes. Enfin, les deux pôles appelés centrosomes chez les eucaryotes supérieurs, se séparent pour former le fuseau mitotique (SAZER *et al.*, 2014).

2.1.2.2. La prométaphase

Au cours de la prométaphase, les microtubules s'assemblent pour former un fuseau bipolaire dont les deux pôles s'organisent autour de chaque centrosome, dupliqué en phase S. Des attachements s'établissent entre les microtubules du fuseau et les chromosomes par l'intermédiaire de structures protéiques, appelées kinétochores, qui s'associent au niveau des centromères (JORDAN M.A *et al.*, 1993).

2.1.2.3. La métaphase

Le fuseau mitotique de microtubules lié aux chromosomes par une protéine appelée kinétochore, les positionne sur le plan équatorial de la cellule (MAYER *et al.*, 1999).

2.1.2.4. L'anaphase

L'anaphase est l'étape décisive au cours de laquelle a lieu la séparation des chromatides sœurs. La séparation des chromosomes fait intervenir dans un premier temps, la migration des chromosomes vers les pôles, sous l'effet du fuseau mitotique à l'aide des microtubules kinétochoriens qui rétrécissent (Anaphase A), et dans un deuxième temps l'allongement du fuseau de division (Anaphase B) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

2.1.2.5. La télophase

En télophase, une fois les chromosomes séparés, le processus de sortie de mitose est enclenché. Les chromosomes se décondensent, l'enveloppe nucléaire se réassemble autour des chromosomes et le fuseau de mitose se désorganise. Finalement le cytoplasme se divise en deux lors de la cytotdièrèse pour former deux cellules filles génétiquement identiques (KAPOOR *et al.*, 2000). La figure 6 résume les différentes phases de mitose.

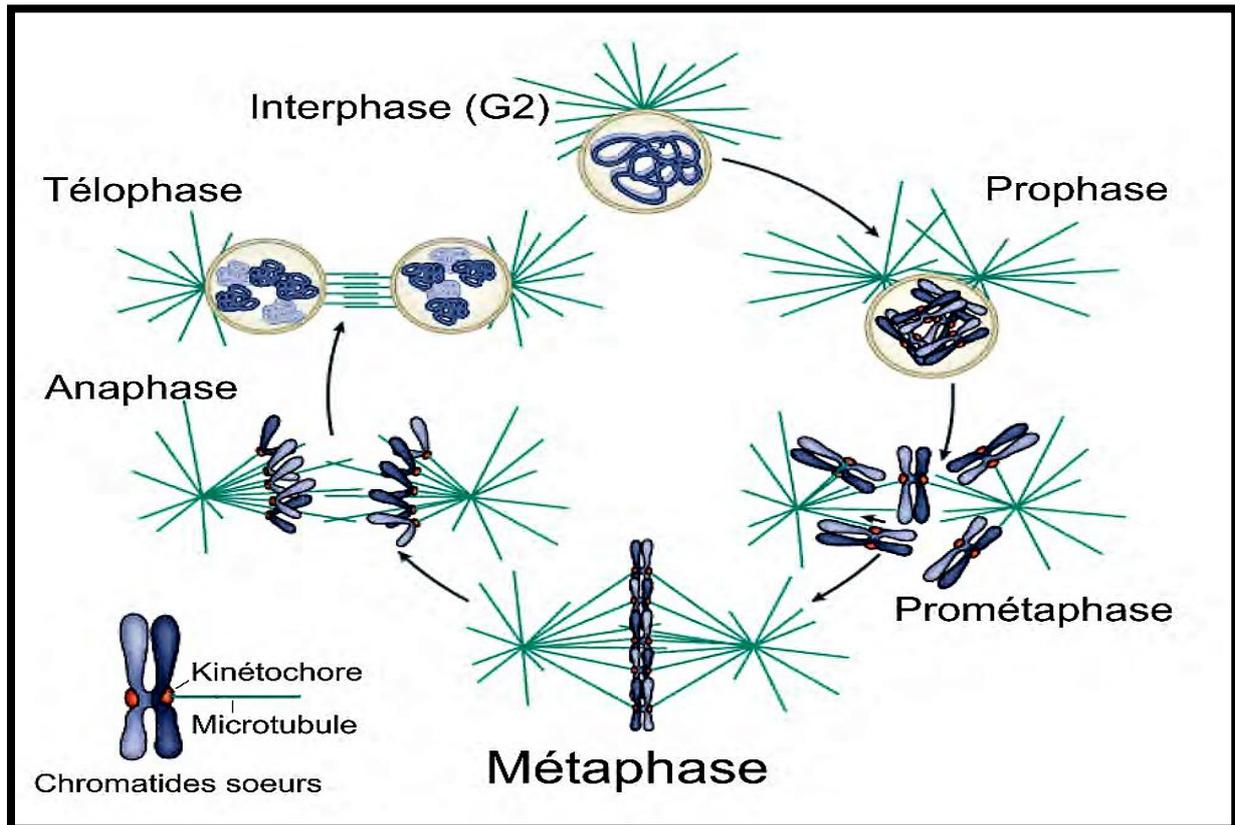


Figure 6 : Les différentes étapes de la mitose (CHEESMAN et DESAI, 2008).

Chapitre III: Activités biologiques des métabolites secondaires

3.1. Les antimitotiques d'origine végétale

La distribution du matériel génétique en deux lots identiques aux cellules filles lors de chaque division cellulaire est réalisée par une structure constituée essentiellement de microtubules: le fuseau de division (CARAZO-SALAS et BRUNET, 2002).

Les microtubules sont des cylindres creux d'un diamètre de 25 nm, présents dans toutes les cellules eucaryotes (MURRAY *et al.*, 2011). Chaque microtubule est un simple tube constitué généralement de 13 protofilaments (NEGI *et al.*, 2015), chacun étant formé de dimères d' α -tubuline et de β -tubuline, qui sont des protéines globulaires étroitement

Partie bibliographique

apparentées, d'une masse moléculaire de 50 kDa (NOGALES *et al.*, 1999 ; CAUDRON, 2007 ; MURRAY *et al.*, 2011) (Figure 7).

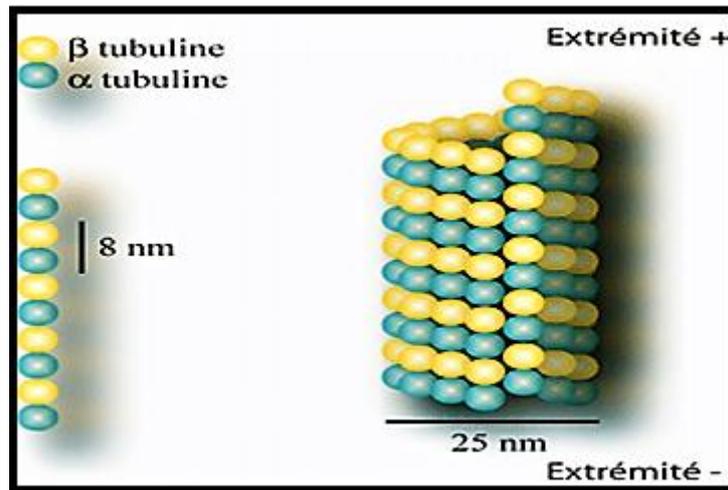


Figure 7: Structure des microtubules (CAUDRON, 2007).

Au sein du fuseau mitotique mature, il existe 3 types de populations de microtubules différentes: les microtubules kinétochoriens qui sont ancrés aux centrosomes et sont directement impliqués dans la ségrégation des chromosomes. Les microtubules inter polaires qui émanent des centrosomes, ils participent à l'établissement et au maintien du fuseau bipolaire ainsi qu'au déplacement des chromosomes à distance égale entre les deux pôles mitotiques. Les microtubules astraux, ils jouent un rôle dans la séparation des centrosomes en prophase et le positionnement du fuseau mitotique (ROSENBLATT, 2005).

Les microtubules et leur dynamique sont les cibles de divers groupes de produits chimiques appelés agents antimitotiques. Ces derniers sont très hétérogènes en terme d'origine, de structure chimique, de domaine de liaison à la tubuline et de mode d'action (JORDAN A. *et al.*, 1998). Ils peuvent avoir un impact significatif sur la division cellulaire, ce qui peut non seulement conduire à des défauts génétiques, mais également provoquer la mort des cellules (WU *et al.*, 2012). Ces poisons agissent sur le fuseau à différents moments (ROBERT, 2007) :

- Au cours de la polymérisation des tubulines en microtubules, ce qui correspond à l'action des inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules (alcaloïdes de vinca, colchicine).
- Au moment de la dépolymérisation des microtubules en tubulines, ce qui correspond à l'action des inhibiteurs de désassemblage des microtubules en tubuline (taxanes).

Partie bibliographique

Cependant le cycle cellulaire peut également être bloqué par des inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes induisant l'apoptose (la quercétine) (EPSIE *et al.*, 1998 ; WOO *et al.*, 2005).

3.1.1. Les inhibiteurs d'assemblage de la tubuline

3.1.1.1. La colchicine

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines charnues du colchique « *colchicum autumnale* », c'est le premier métabolite antimittotique identifié (GARRETT et GRISHAM, 2000). Malgré son activité antimittotique et antiangiogénique importante, la colchicine n'est pas utilisée dans le traitement contre les cancers due à sa toxicité cellulaire élevée (KINGSTON, 2009). Le domaine de liaison de la colchicine, se situe entre les deux sous-unités d'un même dimère (RAVELLI *et al.*, 2004) (Figure 8).

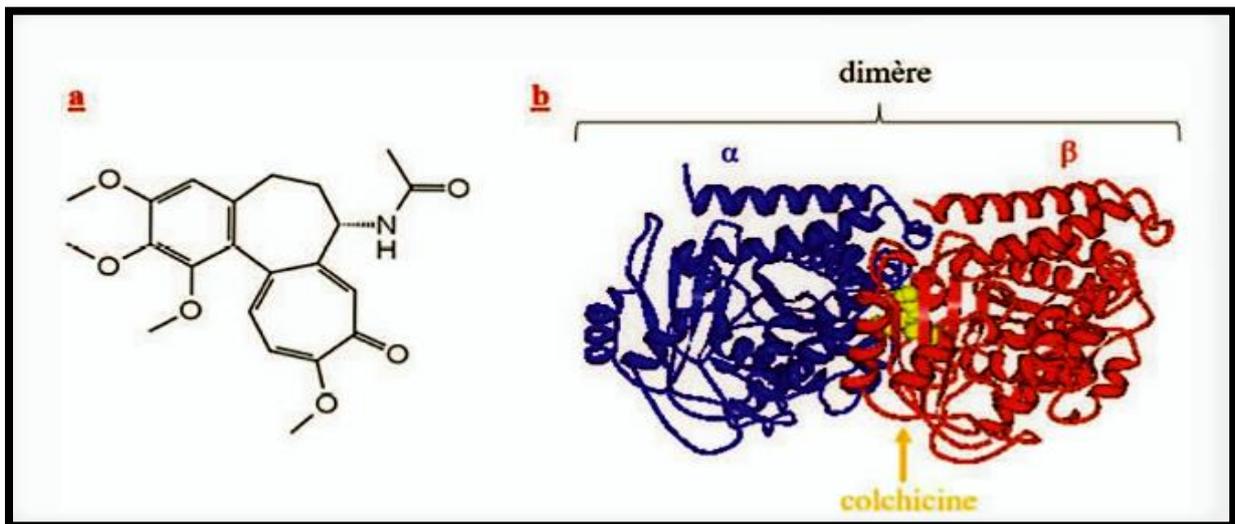


Figure 8: Structure et domaine de liaison de la colchicine sur la tubuline (FIELD *et al.*, 2013).

(a) : Structure chimique de la colchicine ; (b) : Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisée par la colchicine. Les structures secondaires des sous-unités α et β tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. La colchicine est représentée par des sphères jaunes. Structure extraite de Protein Data Bank (4O2B).

On se liant à ce dimère, la colchicine forme un complexe faiblement réversible avec la tubuline. Ce complexe adopte une configuration incurvée défavorable à la polymérisation des microtubules. L'absence ou l'insuffisance des microtubules entraîne le blocage de la division cellulaire au stade métaphase et le transport intracellulaire des vésicules et des organites (GARRETT et GRISHAM, 2000).

Partie bibliographique

3.1.1.2. Les vinca-alcaloïdes

La pervenche de Madagascar est une plante qui produit deux principes actifs appartenant à la famille des alcaloïdes : la vinblastine et la vincristine. Ces composés naturels ou semi-synthétiques sont très largement utilisés en chimiothérapie (GUERITTE et FAHY, 2005). Ces molécules se lient à l'interface entre deux hétérodimères organisés longitudinalement, dans une région proche du site d'échange GDP/GTP (GIGANT *et al.*, 2005) (Figure 9).

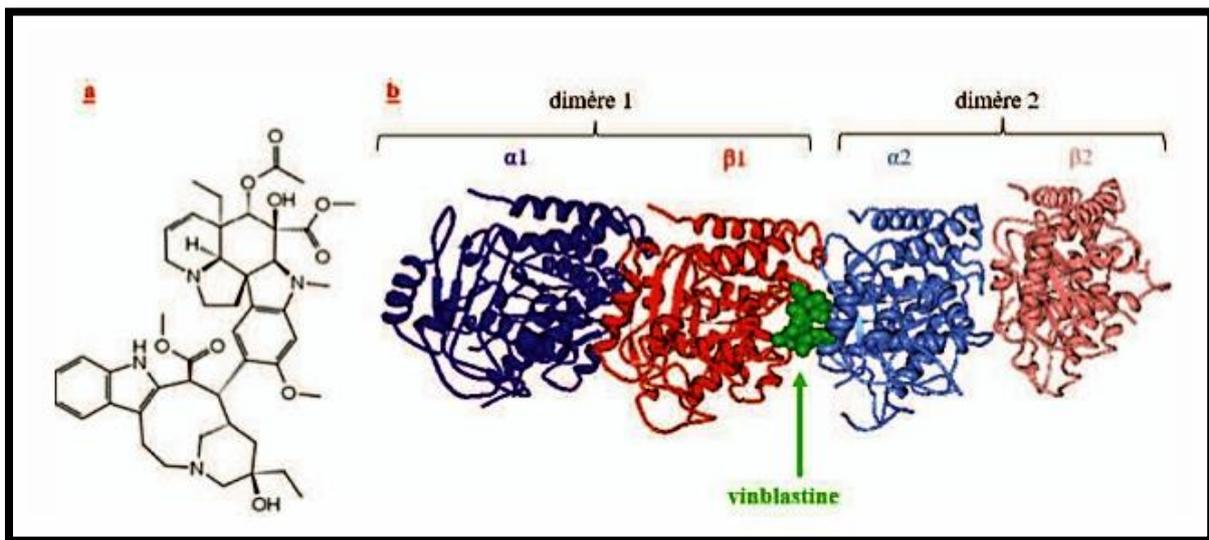


Figure 9 : Structure et domaine de liaison de la vinblastine sur la tubuline (FIELD *et al.*, 2013).

(a) : Structure chimique de la vinblastine ; (b) : Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la vinblastine. Les structures secondaires des sous-unités α et β tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. La vinblastine est représentée par des sphères vertes. Structure extraite de Protein Data Bank (1Z2B).

Après liaison, elles inhibent la formation des microtubules et interfèrent donc avec ses principales fonctions qui sont la formation du fuseau mitotique et l'établissement du cytosquelette, ceci conduit à un blocage de la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau et la dispersion des chromosomes (EPSIE *et al.*, 1998).

3.1.2. Les inhibiteurs de désassemblage des microtubules

3.1.2.1. Les taxoïdes

Initialement isolé de l'écorce de *Taxus brevifolia*, le paclitaxel fut le premier MSA (Microtubule Stabilizing Agent) identifié. Le paclitaxel et ses analogues structuraux semi-

Partie bibliographique

synthétiques (docétaxel) constituent le groupe des taxanes et sont utilisés depuis les années 1990 dans le traitement de nombreux cancers (SCHIFF *et al.*, 1979).

Le domaine de liaison des taxoïdes se situe sur la tubuline β entre la boucle M et une poche hydrophobe, au niveau de la partie luminale des microtubules (Figure 10). Ce domaine est accessible dans les microtubules préformés (DIAZ, 2000). La cinétique de liaison du ligand à la tubuline est rapide (DIAZ, 2003), ce qui suggère l'existence d'un domaine intermédiaire auquel le médicament se lie pour accéder au site interne de liaison (DIAZ *et al.*, 2005 ; BARASOAIN *et al.*, 2010).

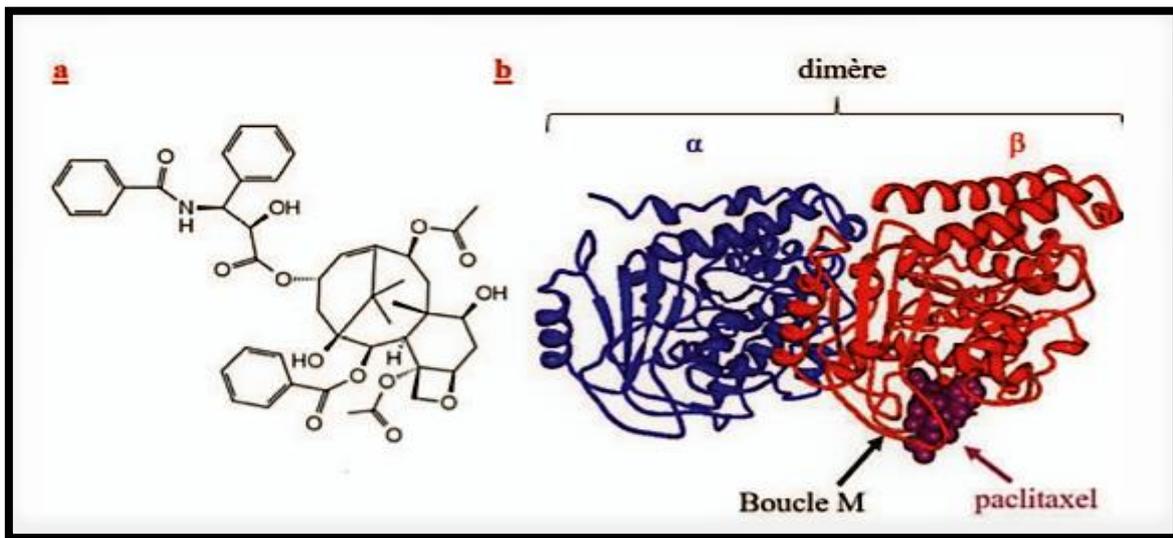


Figure 10 : Structure et domaine de liaison du paclitaxel sur la tubuline (FIELD *et al.*, 2013).
(a) : Structure chimique du paclitaxel ; (b) : Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline stabilisé par le paclitaxel. Les structures secondaires des sous-unités α et β tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. Le paclitaxel est représenté par des sphères violettes. Structure extraite du site web Protein Data Bank (1JFF).

Les taxoïdes en se liant aux tubulines, facilitent leur polymérisation, inhibant ainsi la dépolymérisation des microtubules, ils empêchent donc la formation et la disparition des fuseaux mitotiques (DABYDEEN *et al.*, 2006 ; EPSIE *et al.*, 1998).

3.1.3. Les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes

3.1.3.1. La quercétine

Les régulateurs du cycle cellulaire sont considérés comme des cibles privilégiés d'inhibiteurs sélectifs et puissants. La quercétine est l'un des flavonols le plus répondeur dans les végétaux notamment dans les parties aériennes du genre *Verbascum*. Ce flavonoïde est responsable de l'inhibition des kinases cyclines-dépendantes en introduisant un composé

Partie bibliographique

semblable à l'ATP au niveau du site de phosphorylation de cette dernière, bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire (MEIJER *et al.*, 2001) (Figure 11).

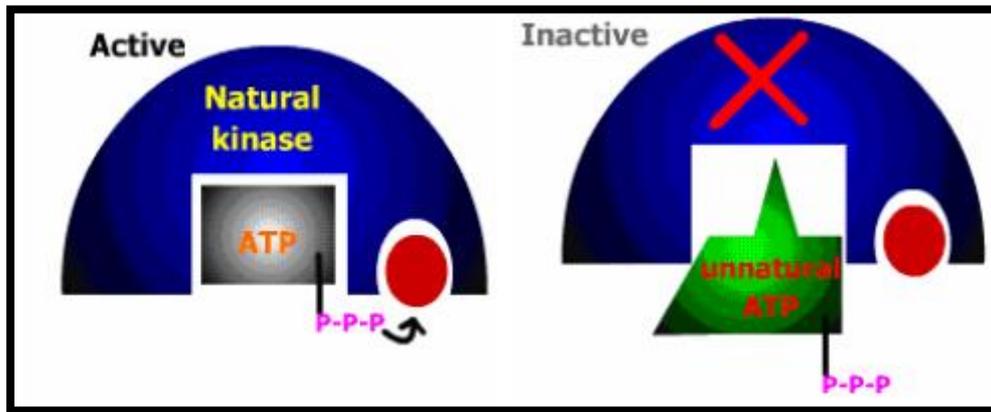


Figure 11: Mécanisme d'action des inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes (BADR *et al.*, 1992).

3.2. L'effet des métabolites secondaires sur la membrane érythrocytaire

3.2.1 L'érythrocyte

L'érythrocyte, appelé aussi hématie ou globule rouge, est une cellule très simplifiée, anucléée chez l'Homme et les mammifères. Elle est produite essentiellement dans la moelle osseuse à partir de cellules mères ; les érythroblastes médullaires. Le globule rouge est l'un des composants essentiels du sang : il représente 40 à 50 % de son volume. Ils présentent une couleur rouge qui provient d'un pigment qui est le constituant principal, à savoir l'hémoglobine (Hb) (DELAUNAY et BOIVIN, 1990). L'Hb permet le transport de gaz à travers l'organisme : le dioxygène vers les cellules et une partie du dioxyde de carbone vers les poumons (SCHMID-SCHONBEIN *et al.*, 1979).

L'érythrocyte se présente sous la forme d'un disque biconcave, d'un diamètre de 7 à 8 μm . Il est doué d'une grande déformabilité qui lui permet de franchir des capillaires d'un diamètre inférieur au sien. Ce qui nécessite des propriétés élastiques remarquables (EVANS et FUNG, 1972) (Figure 12).

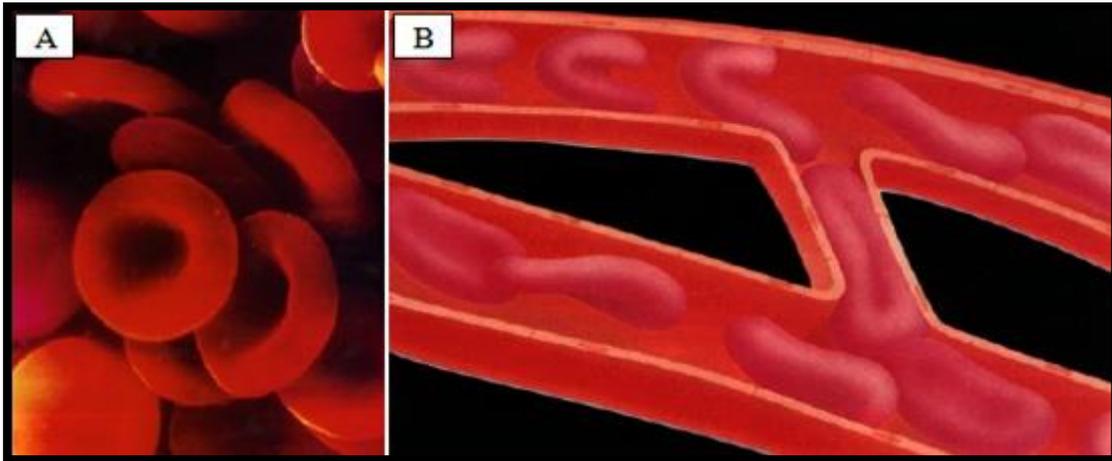


Figure 12 : Image de globules rouges humains (DELAUNAY et BOIVIN, 1990).

(a) : Globule rouge vue par microscopie électronique ; (b) : Dessin de globules rouges dans un capillaire.

La membrane du globule rouge est constituée d'une bicouche lipidique sous laquelle est ancré un réseau bidimensionnel hautement organisé de protéines : le squelette. Ce dernier tapisse la face interne de la bicouche lipidique. Il est constitué de longs filaments de spectrine reliés entre eux par des complexes de jonction. Ces complexes sont principalement composés d'actine filamenteuse, de protéines et de tropomyosines. Les érythrocytes ont été largement étudiés comme cellules modèles pour plusieurs raisons: il s'agit d'un modèle simplifié de membranes plasmiques cellulaires en raison de l'absence de noyau et d'organites. Leur hémolyse peut être facilement contrôlée par spectrophotométrie en raison de la libération d'hémoglobine (DELAUNAY et BOIVIN, 1990).

3.2.2. L'hémolyse

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible dû à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de leurs membranes cellulaires (THOMAS, 2013).

Les produits phytochimiques sont dotés de propriétés cytotoxiques, ce sont des solutions prometteuses pour remplacer les médicaments conventionnels en raison d'une toxicité moindre pour les cellules normales. L'interaction d'un composé cytotoxique avec la membrane des globules rouges provoque la perte de leur intégrité ce qui conduit à leur lyse (TIWARI *et al.*, 2011).

3.2.3. Effet des polyphénols sur la stabilité membranaire

Les polyphénols inhibent l'activité de l'ATPase et perturbent le transport des ions à travers les membranes. Dans les cellules animales, les flavonoïdes affectent le transport

Partie bibliographique

des ions membranaires par inhibition de l'ATPase Ca^{2+} - Mg^{2+} , de la Na^{+} - K^{+} ATPase, de l'ATPase mitochondriale et des AMPc et GMP-phosphodiesterases (Figure 13). Le mode d'interaction membranaire des flavonoïdes a été principalement attribué à leur lipophile et à leur structure plane (SELVARAJ *et al.*, 2015). ONTIVEROS *et al.* (2019) soulignent que les effets de la quercétine sur les cellules sont associés à des modifications des propriétés de la membrane cellulaire.

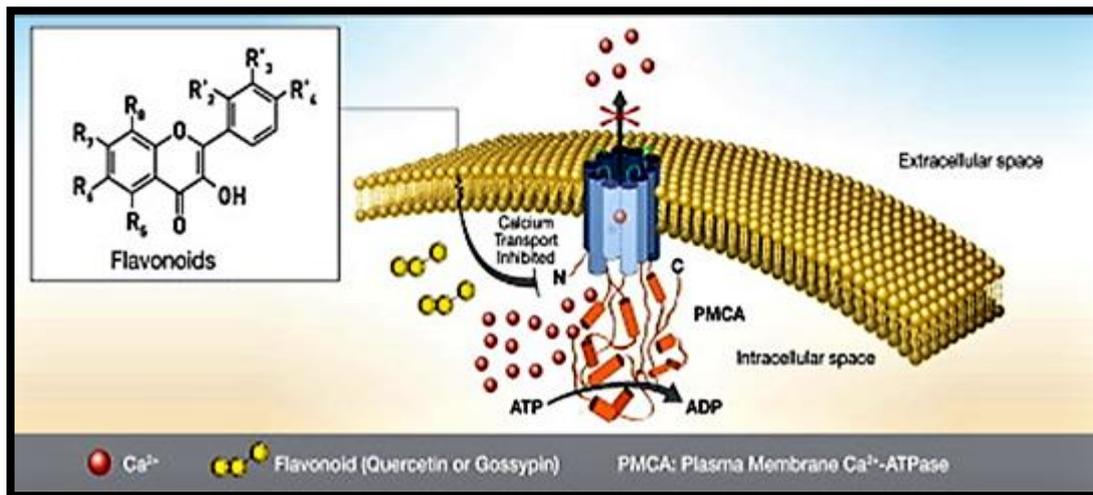


Figure 13 : Inhibition de l'ATPase membranaire par les flavonoïdes (ONTIVEROS *et al.*, 2019).

3.2.4. Effet des saponines sur la membrane érythrocytaire

L'activité hémolytique des saponines est due aux effets sur la perméabilité de la membrane cellulaire en formant des pores dans les membranes, en modifiant les activités ATPase sodium – potassium et calcium – magnésium ou en insérant le noyau hydrophobe de la saponine dans la bicouche lipidique (SARIKAHYA *et al.*, 2018). Ils s'accumulent en plaques et provoquent une courbure de la membrane qui conduit ensuite à la formation de ces pores (ARMAH *et al.*, 1999) ou à des protubérances hémitubulaires, conduisant à une extraction de stérols par vésiculation (KEUKENS *et al.*, 1995). Après leur intégration dans les membranes, ils interfèrent avec des fonctionnalités de domaines spécifiques (AUGUSTIN *et al.*, 2011) (Figure 14).

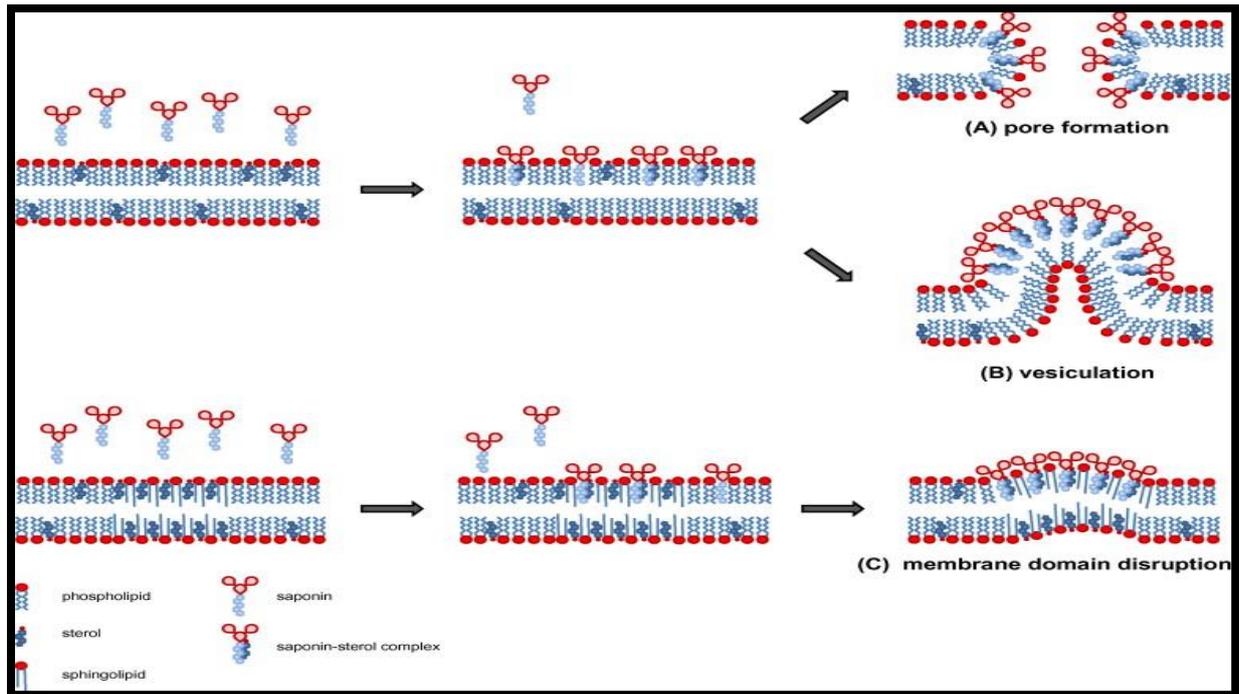


Figure 14 : Modèles schématiques des mécanismes moléculaires de l'activité de la saponine vis-à-vis des membranes (AUGUSTIN *et al.*, 2011).

(A) : Formation de pores ; (B) : formation de vésicules ; (C) : perturbation de la membrane.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes

Lors de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'extraction et au dosage de la fraction flavonoïque de feuilles de *Verbascum sinuatum* L. Nous avons déterminé l'action de cette fraction sur la division cellulaire de cellules méristématiques de bulbes d'oignons (*Allium cepa*), ainsi que l'effet de cette dernière sur la membrane érythrocytaire.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) au niveau de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, dans le département de Biochimie et de Microbiologie à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

1.1. Matériel

1.1.2. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est constitué de feuilles de *Verbascum sinuatum* L. récoltées dans la région d'Adekar Assif El Hemmam à Bejaia en mai 2017. Nous avons également utilisé du sang humain.

1.1.2. Réactifs et solvants

Les réactifs et les solvants que nous avons utilisés sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Réactifs et solvants utilisés.

Composés	Concentration	Fonction
Méthanol	99,7 %	Solvant d'extraction
N-butanol	99,5 %	
Acétate d'éthyle	99,5 %	
Eau physiologique	9%	Etude de l'activité anti hémolytique
Eau distillé	--	Témoin négatif
Carmin acétique	--	Colorant
quercétine	1mg/ml	Témoin + (étude de l'activité antimototique)
Saponine	1mg/ml	Témoin + (étude de l'activité anti hémolytique)
AlCl ₃	2%	Dosage des flavonoïdes

1.1.3. Matériel de laboratoire

En plus du gros matériel de laboratoire à savoir : l'évaporateur rotatif, le spectrophotomètre et la centrifugeuse, nous avons également utilisé la verrerie usuelle dont les ampoules à décanter.

Partie expérimentale

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation du matériel végétal

Des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ont été sélectionnées, nettoyées, séchées puis broyées en fine poudre et conservées à température ambiante et à l'abri de la lumière.

1.2.2. Extraction des fractions flavonoïques

L'extraction des flavonoïdes a porté sur la macération d'un gramme de poudre de *Verbascum sinuatum* L. dans du méthanol, suivi d'une extraction avec différents solvants à polarités variables (BEKKARA *et al.*, 1998), nous avons ainsi obtenu deux fractions (fraction aqueuse et fraction butanolique) (Figure 15). Ces deux fractions sont évaporées à 60°C puis solubilisées soit dans du méthanol pour le dosage des flavonoïdes ou dans de l'eau physiologique pour l'évaluation *in vitro* de l'activité sur la membrane érythrocytaire.

Partie expérimentale

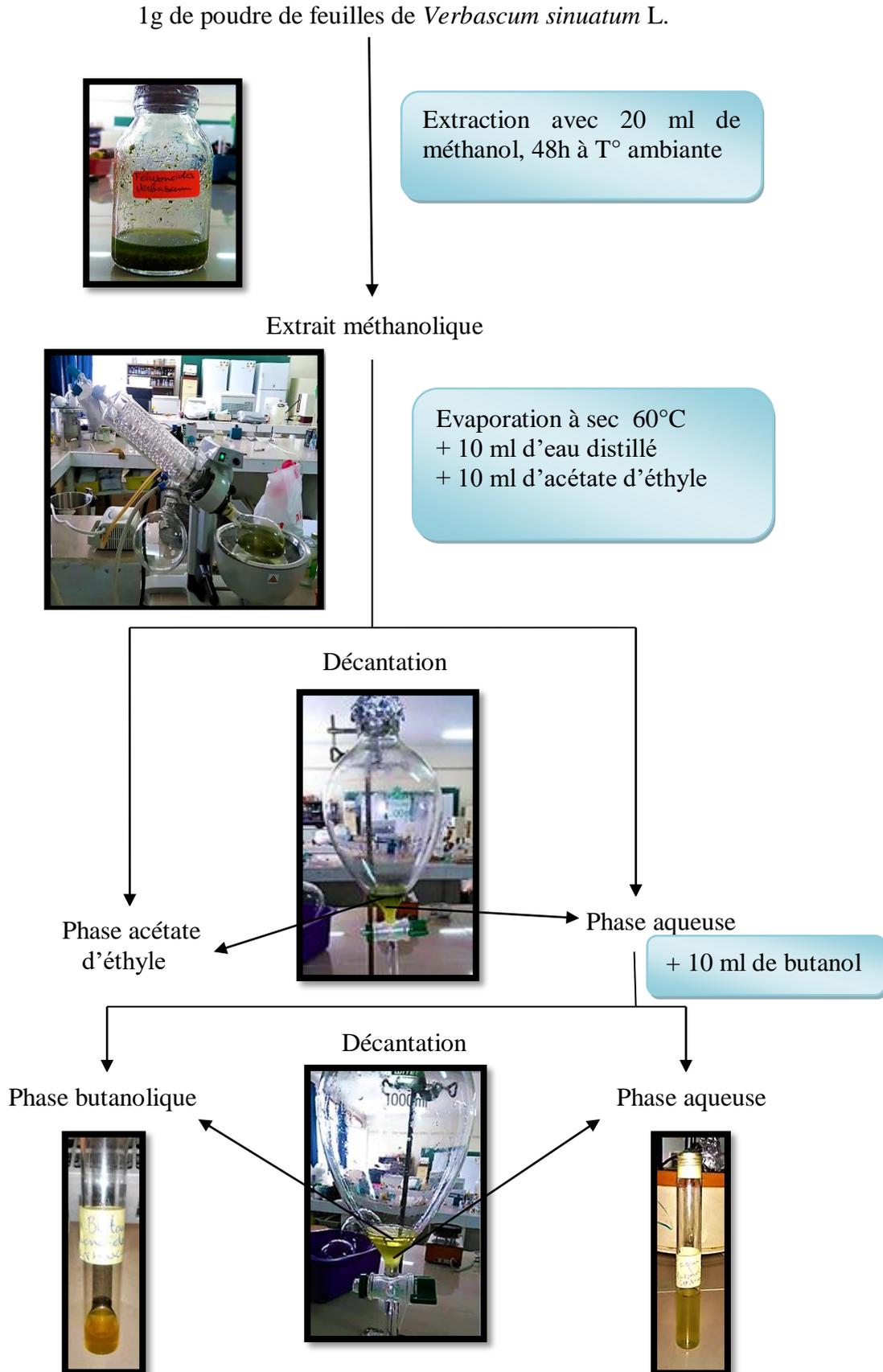


Figure 15: Extraction des fractions flavonoïques.

Partie expérimentale

1.2.3. Dosage des fractions flavonoïques

Pour doser nos fractions flavonoïques (butanolique et aqueuse), nous avons réalisé une gamme étalon en utilisant comme standard la quercétine avec une concentration allant de 10 µg/ml à 60 µg/ml. 1 ml d'AlCl₃ est additionné aux différents tubes. Après 10 minutes d'incubation, la densité optique (DO) est déterminée à 430 nm contre un blanc constitué de méthanol et d'AlCl₃ (RADJENDRA *et al.*, 2015 ; SHAZIA *et al.*, 2016). Cette DO est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes. Nos échantillons ont été préparés selon les mêmes étapes (3 essais ont été réalisés plus ou moins une erreur standard). La concentration en flavonoïdes est déterminée par extrapolation sur courbe étalon.

1.2.4. Evaluation *in vitro* de l'activité antimittotique

Des bulbes d'oignons ont été mis à germer pendant une durée de 48 à 72 heures, des racines contenant les cellules méristématiques ont été sélectionnées et mises en contact pendant 24h avec nos témoins (témoin négatif : eau distillée et témoin positif : quercétine 1mg/ml) et nos différentes fractions extraites (fraction aqueuse et butanolique). Ces dernières sont ensuite fixées à l'aide d'une solution de fixation (composée d'alcool et d'acide acétique) et colorées au carmin acétique, puis observées au microscope optique (X40) (SHWETA *et al.*, 2012). Plusieurs indices ont été calculés (5 répétitions ont été réalisées plus au moins une erreur standard) à l'aide des équations ci-dessous :

L'indice mitotique (IM) a été calculé selon l'équation utilisée par (IKEDA *et al.*, 2000).

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

L'indice de phase (IP) a été calculé selon l'équation utilisée par (GLINSKA *et al.*, 2007).

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

Partie expérimentale

Nous avons également calculé l'indice d'aberration (IA) avec l'équation utilisée par (RACUCIU et CREANGA, 2007).

$$\text{IA}(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules aberrantes}}{350 \text{ cellules}} \times 100$$

Enfin la valeur limite de cytotoxicité (VLC) à aussi été déterminée selon l'équation utilisée par (ANTONSIE-WIEZ *et al.*, 1990).

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

Partie expérimentale

La figure suivante résume les différentes étapes de l'évaluation de l'activité antimittotique.

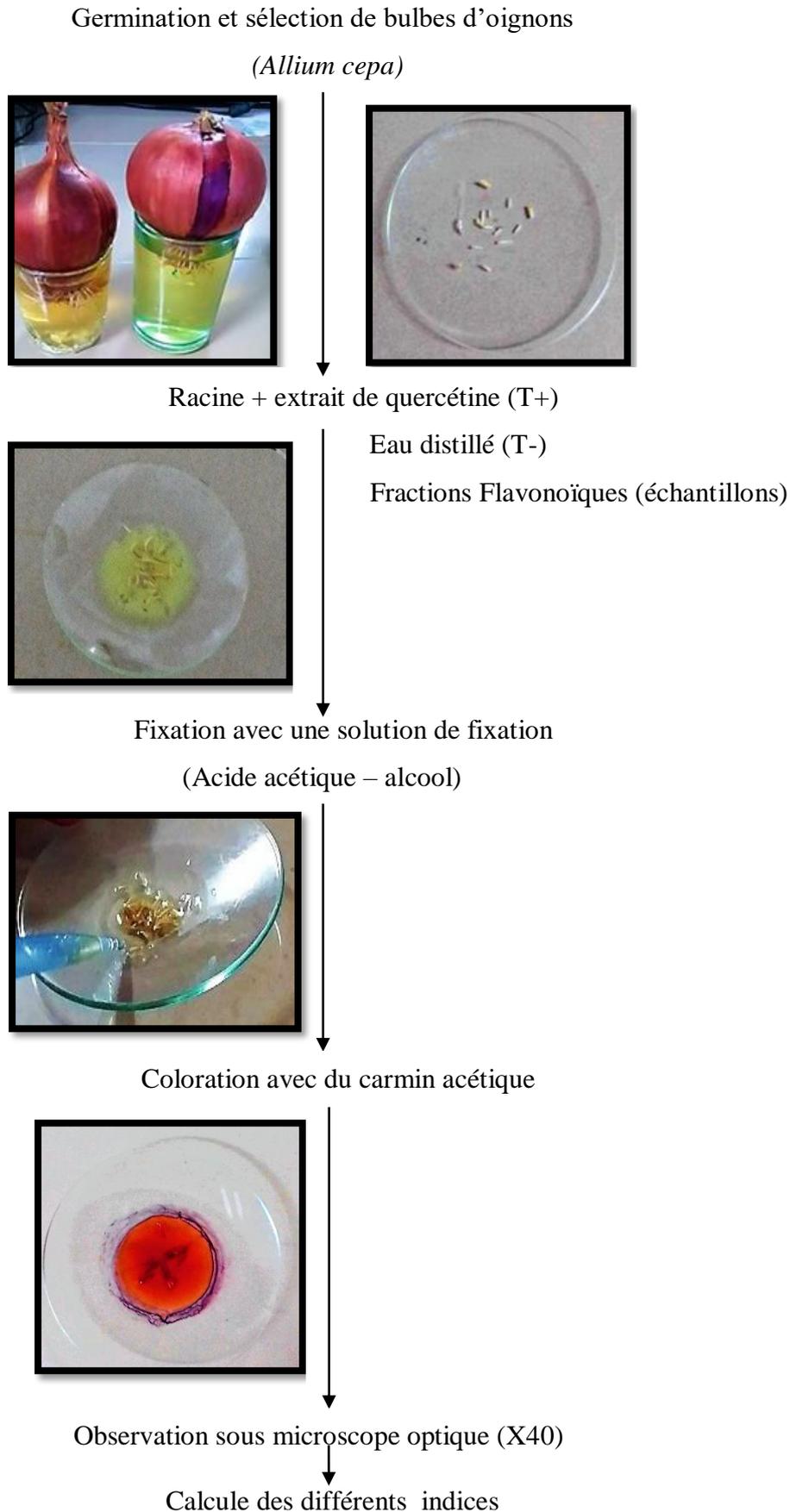


Figure 16: Principales étapes de l'évaluation de l'activité antimittotique.

Partie expérimentale

1.2.5. Évaluation *in vitro* de l'action des fractions sur la membrane érythrocytaire

Pour évaluer *in vitro* l'activité de nos fractions flavonoïques sur la membrane érythrocytaire, nous avons réalisé un prélèvement sanguin dans un tube hépariné. Après centrifugation et élimination du plasma, nous avons effectué trois lavages au culot avec de l'eau physiologique. À partir de ce dernier, nous avons préparé une suspension érythrocytaire à 2%. L'action de nos échantillons sur la stabilité membranaire est déterminée en mettant 1 ml de notre échantillon (aqueux/butanolique) en contacte d'un ml de la suspension préalablement préparée. Après 20 min d'incubation sous agitation modéré, nous avons centrifugé et déterminé la DO à 530 nm (DUCHNOWICZ, 2012 ; AICHE -IRATNI *et al.*, 2015). Cette DO est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine libéré par hémolyse.

Nous avons également préparé deux tubes :

- Un tube contenant les globules rouges et la saponine (T+) qui présente 100% d'hémolyse.
- Un tube contenant les globules rouges et de l'eau physiologique (T-) qui ne présente pas d'hémolyse.

Le pourcentage d'hémolyse de nos échantillons a été déterminé grâce à la formule suivante :

$$X (\%) = \frac{\text{DO de l'échantillon} \times 100\% \text{ d'hémolyse}}{\text{DO de la saponine}}$$

La figure suivante représente les différentes étapes de l'évaluation de l'activité hémolytique de la fraction aqueuse et butanolique.

Partie expérimentale

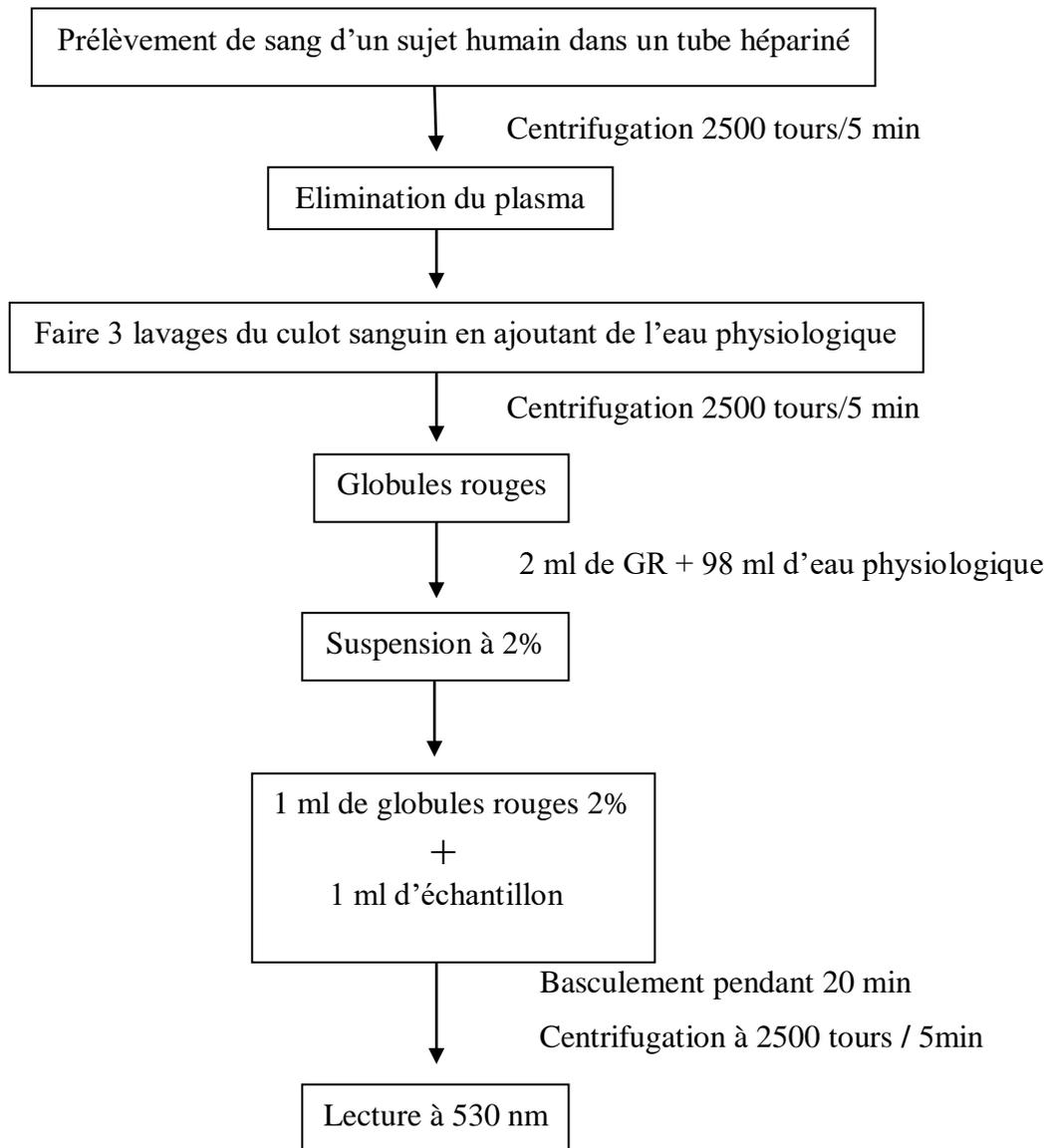


Figure 17: Préparation de la suspension et évaluation de l'activité sur la membrane érythrocytaire.

1.2.6. Etude statistiques

Pour cette étude, nous avons réalisé le teste ANOVA à un facteur avec le logiciel Statistica. Ce test a pour but la comparaison des moyennes des variables quantitatives à savoir : l'indice mitotique (IM), l'indice de phase (IP), l'indice d'aberration (IA) et la valeur limite de cytotoxicité (VLC) selon un facteur qualitatif qui représente nos témoins (T+ et T-) ainsi que nos deux fractions (aqueuse et butanolique).

Partie expérimentale

2. Résultats et discussions

2.1. Composition des fractions flavonoïques

Pour le dosage des flavonoïdes de nos deux fractions à savoir la fraction butanolique et aqueuse nous avons établi une courbe étalon avec la quercétine comme standard (Figure 18). En se basant sur l'équation de la droite de régression obtenue : $Y=0.0175 X$ et des différentes densités optiques de nos échantillons qui sont détaillées en annexe 1. Nous avons déterminé la concentration de ces derniers qui est de $95,4 \pm 0.01 \mu\text{g}$ équivalent quercétine/ml de fraction pour la fraction butanolique et de $97,7 \pm 0.02 \mu\text{g EQ/ml}$ de fraction pour la fraction aqueuse.

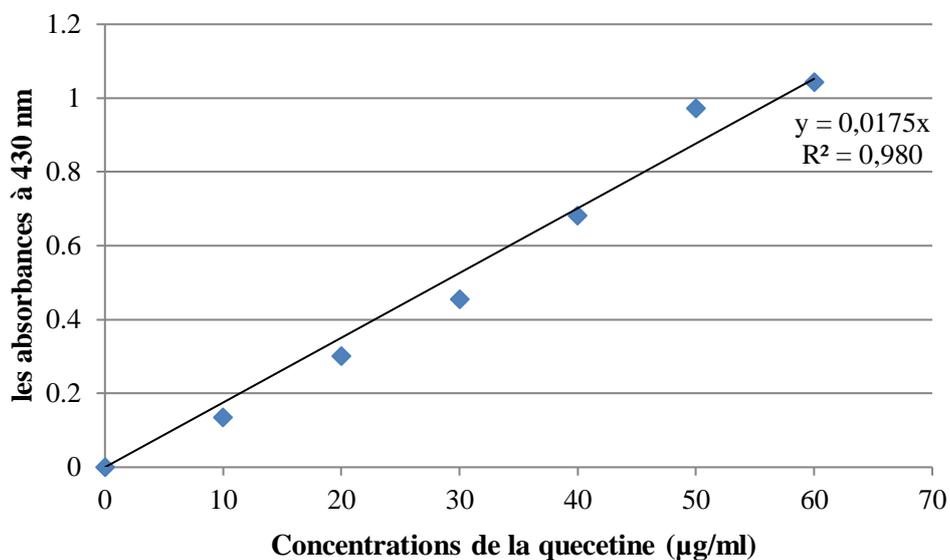


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés bioactifs existants dans le matériel végétal. Elle est influencée par leur nature chimique, la méthode utilisée, la taille de l'échantillon étudié, ainsi que la présence de substances interférentes (STALIKAS, 2007). Cependant plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques notamment les flavonoïdes. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur la teneur en polyphénols (BOUZID *et al.*, 2011).

Le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur leur degré de solubilité dans les solvants organiques (BRUNETON, 1999 ; KEBIECHE *et al.*, 2011). Cette méthode comprend deux grandes étapes: la première phase d'extraction se fait avec le

Partie expérimentale

méthanol pour solubiliser les flavonoïdes. La seconde est réalisée par fractionnement de l'extrait méthanolique à l'aide d'une série de solvants de polarités différentes (acétate d'éthyle et butanol) afin d'assurer une extraction maximale des flavonoïdes (KEBIECHE *et al.*, 2011; KALININA *et al.*, 2014). A la fin du protocole, nous avons récupéré la phase butanolique et la phase aqueuse. La phase butanolique contient des flavonoïdes di et tri glycosidiques et la phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires (KEBIECHE *et al.*, 2011; FEKNOUS *et al.*, 2014; ALILOU *et al.*, 2014) et des anthocyanes (ALILOU *et al.*, 2014).

MIHAILOVIC *et al.* (2016) ont démontré que les flavonols est la classe la plus rencontrée dans l'extrait méthanolique de *Verbascum phlomoides* que dans les extraits de *Verbascum nigrum* et de *Verbascum thapsus*. Les extraits méthanoliques de *Verbascum phlomoides* et *Verbascum thapsus* sont riches en lutéoline, alors que l'apigénine n'a été identifiée que dans l'extrait de *Verbascum phlomoides*.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus à partir des études menées sur des espèces de *Verbascum* et sur différents solvants, nous pouvons noter une grande diversité. C'est ainsi que nous avons obtenu des teneurs élevées qui se rapprochent des valeurs obtenues par LUCA *et al.* (2019), dans l'extrait aqueux et butanolique de *Verbascum ovalifolium* qui sont respectivement 107.42 ± 0.34 et 106.57 ± 0.52 μg équivalent catéchine/mg d'extrait tandis que l'extrait méthanolique a une valeur de 92.21 μg EC/mg d'extrait sec contrairement à celles retrouvées par NOFOUZI (2015) qui ont une teneur de 30.79 ± 0.5 μg équivalent rutine par mg d'extrait méthanolique de *Verbascum speciosum*. De même que pour *Verbascum phlomoides* qui comprend 53.4 ± 0.2 μg équivalent rutine par mg d'extrait sec (MIHAILOVIC *et al.*, 2016).

2.2. Evaluation de l'effet antimittotique

2.2.1. Détermination des différents indices

L'effet antimittotique de la fraction flavonoïque de *Verbascum sinuatum* L. a été étudié avec le test *Allium cepa*. Il s'agit d'un test sensible, dans lequel des cellules des méristématiques racinaires sont utilisées pour le criblage *in vitro* de médicaments anticancéreux, de diverses substances et des extraits de plantes ayant une activité antimittotique (LATHA *et al.*, 1998; TIMOTHY *et al.*, 2014; SUMITHA et THOPPIL, 2016).

Nous avons déterminé les indices mitotiques de nos témoins et de nos deux fractions qui correspondent au rapport entre le nombre de cellules en division sur le nombre de cellules

Partie expérimentale

examinées fois 100, ainsi que les indices de phase qui représentent le rapport entre le nombre de cellules dans les différentes phases (prophase, métaphase, anaphase, télophase) sur le nombre de cellules examinées fois 100 (Tableau III).

Tableau III: Indices mitotiques et indices de phases des différentes fractions étudiées.

Fractions	Indices	IM ± ES (%)	P ± ES (%)	M ± ES (%)	A ± ES (%)	T ± ES (%)
T-		92,20±1,34	82,91±3,07	0,63±0,40	0,97±0,36	8,00 ±3,54
T+		44,40±0,72	39,08±1,37	0,057±0,05	0,57 ±0,39	5,14 ±1,00
FB		47,20±1,03	42,00±2,22	0,057±0,05	0,57 ±0,35	5,03 ±1,86
FA		70,00±0,75	65,37±2,20	0,17 ±0,10	0,46 ±0,13	4,11 ±1,70

T- : Témoin négatif (eau distillé), T+ : Témoin positif (quercétine 1 mg/ml), FB : Fraction butanolique, FA : Fraction aqueuse, IM : Indice mitotique, ES : Erreur standard, P : Prophase, M : Métaphase, A : Anaphase, T : Télophase.

L'indice mitotique est considéré comme un paramètre permettant d'estimer la fréquence de la division cellulaire en mesurant la proportion de cellules en phase M du cycle cellulaire (MARCANO *et al.*, 2006). L'indice mitotique le plus élevé des cellules méristématiques d'*A. cepa* traitées avec nos différents témoins et fractions est celui représenté par le T- qui est de 92,20±1,34%. Contrairement au T+ qui présente l'IM le plus faible (44,40±0,72%). D'autre part l'indice de phase le plus élevé est celui du T- qui est de 82,91±3,07%. Cette indice est représenté majoritairement par des prophases et cela pour tous les extraits et les témoins testés. Par contre, on distingue une diminution remarquable du pourcentage des indices des autres phases (métaphase, anaphase, télophase) comparativement au T-.

Des ANOVA réalisées entre le témoin négatif, la quercétine prise comme standard et les différentes fractions flavonoïques, montrent une différence hautement significative ($p=0,00$) entre les indices mitotiques. Ceci confirme l'effet antimitotique du T+ et de nos différents échantillons. Cependant la fraction butanolique présente un effet antimitotique similaire à la quercétine qui ont révélés aucune différence significative ($P > \alpha (0,05)$). De même pour les indices de phases (IP) qui ne présentent pas de différence significative ($P > 0,05$) (annexe 2).

Des études similaires menées par RAHEEL *et al.* (2017) sur les extraits d'écorce de tige de *Ficus benghalensis* L. (Moraceae) avec le test *Allium* ont révéler une activité

Partie expérimentale

antimitotique plus forte pour la fraction butanolique avec un IM de $28 \pm 0.57\%$ comparativement à notre fraction butanolique qui comprend un IM de $47,20 \pm 1,03\%$, alors que la fraction aqueuse présentait un IM de $83 \pm 1.52\%$ qui se rapproche de notre fraction aqueuse ($70,00 \pm 0,75$). De pareils effets ont également été observés dans les cellules d'*A. cepa* traitées avec l'extrait méthanolique d'*Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) (YUET-PING *et al.*, 2012) et chez les deux extraits de plantes *Hyptis suaveolens* L. et *Leucas indica* L. (SUMITHA et THOPPIL, 2016).

Pour mieux comprendre les causes de cette activité antimitotique, plusieurs études ont été réalisées. AKINBORO et BAKARE (2007) ont démontré que la diminution de l'activité mitotique des cellules méristématiques d'*Allium cepa*, indique un effet mitodépresseur des extraits flavonoïques des feuilles de *Verbascum*. De pareils effets mitodépresseurs ont été observés chez les cellules méristématiques d'*A. cepa* traitées par les extraits aqueux de *Peganum harmala* et *Ruta chalepensis*. Cette inhibition pourrait être interprétée comme la mort cellulaire ou un retard dans la cinétique de prolifération cellulaire (YUET-PING *et al.*, 2012). Cela suggère que les extraits testés ou bien leurs composants doivent interférer avec le développement normal de la mitose ou empêchant un nombre de cellules d'entrer en mitose, bloquant ainsi le cycle mitotique durant l'interphase (EL-GHAMERY *et al.*, 2000). En outre, la réduction de l'activité mitotique pourrait être due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et des nucléoprotéines du système biologique, à une prolongation de la durée de la phase G1 et S (RAHEEL *et al.*, 2017), ou bien au blocage du cycle cellulaire en phase G2. Par conséquent la cellule ne peut pas entrer en mitose (AHMAD *et al.*, 2014 ; SUMITHA et THOPPIL, 2016 ; RAHEEL *et al.*, 2017). SUMITHA et THOPPIL (2016) ont expliqué cet effet par le blocage de la prophase ou l'arrêt d'une ou plusieurs phases mitotiques.

En ce qui concerne l'indice de phase qui est le rapport entre le nombre de cellules dans les différentes phases sur le nombre de cellules examinées fois 100. En concordance avec les travaux de TOMAR *et al.* (2018), nos résultats montrent qu'il y avait aussi une réduction du nombre de cellules en division dans les différentes phases du cycle cellulaire. La fraction butanolique a diminué le nombre de cellules en prophase de façon proche du control positif, ce qui indique que les cellules pourraient être mortes avant d'entrer dans la division mitotique, c'est-à-dire dans la phase S du cycle où l'ADN se duplique. Cependant, l'indice de phase est représenté majoritairement par des prophases, pour les deux fractions et les témoins testés. FUSCONI *et al.* (2006) ont suggéré que cela est lié à une intense altération des microtubules en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade métaphase.

Partie expérimentale

Des études ont également été réalisées sur les mycoendophytes ; champignons mutualistes vivant dans les tissus végétaux sans causer de maladies apparentes produisant le lapachol à partir de deux souches fongiques ; *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*, engendrent la diminution de l'IM, la fragmentation de l'ADN et l'arrêt de la croissance cellulaire (SEHGAL *et al.*, 2006 ; BHUJBAL *et al.*, 2011; SHWETA *et al.*, 2012; JANGALA *et al.*, 2012; YUET- PING *et al.*, 2012 ; OUZID *et al.*, 2019).

2.2.2. Principales anomalies de la division cellulaire

Nous avons déterminé le pourcentage de cellules présentant différentes aberrations de la division cellulaire qui correspond au rapport entre le total des aberrations rencontrées sur le total des cellules examinées fois 100 (tableau IV).

Tableau IV: Indices d'aberrations des différents extraits flavonoïques.

Aberration %	AG	CB	AL	PC	FR	DP	CG	CS	CA	AC	Total
T(+)	8,97±1,76	0,00±0,00	1,71±0,56	0,00±0,00	6,74±2,58	0,17±0,10	1,08±0,95	0,00±0,00	1,14±1,02	3,54±0,71	23,35±7,68
FB	10,86±2,43	0,00±0,00	2,34±0,69	0,057±0,05	4,17±1,53	0,23±0,05	1,37±0,42	2,00±1,30	0,68±0,61	4,8±0,98	26,51±8,06
FA	4,11±0,24	0,17±0,15	0,68±0,37	0,00±0,00	2,74±0,52	0,00±0,00	0,8±0,24	0,34±0,15	0,00±0,00	3,31±1,16	12,04±2,83

T+: Témoin positif (quercétine 1mg/ml), **FB:** Fraction butanolique, **FA:** Fraction aqueuse.

IA : Indice d'aberration, **AG :** Agglutinations chromosomiques, **CB :** Cellules binucléées, **AL :** Allongement des cellules, **PC :** Ponts chromosomiques, **FR :** Fragmentations chromosomiques, **DP :** Désorganisation de plaque équatorial lors de la métaphase, **CG :** Cellules gigantesques, **CS :** Cellules sans noyaux, **CA :** Corps apoptotiques, **AC :** Absence de cytotièrese.

On constate que les cellules traitées avec la fraction butanolique présentent les aberrations chromosomiques les plus variées avec un indice d'aberration total de 26,51±8,06% qui est une valeur supérieur à celle du T+ (23,35±7,68%), contrairement à la fraction aqueuse (12,04±2,83%). Les fragmentations et les agglutinations chromosomiques sont les anomalies les plus rencontrées avec un pourcentage très élevé dans les cellules méristématiques d'*A. cepa* traitées avec les deux fractions et le T+. Par ailleurs nous avons remarqué que les ponts chromosomiques et les cellules binucléées représentent les aberrations les moins fréquentes et se retrouvent uniquement dans les cellules méristématiques traitées avec la fraction butanolique (0,057±0,05%).

Partie expérimentale

L'étude statistique réalisée par ANOVA pour les indices d'aberrations (IA) a révélé qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux fractions et le T+ ($P > 0.05$) (annexe 2). Cela signifie qu'elles ont exercé un effet antimitotique similaire à la quercétine prise comme standard. Ces résultats expliquent les différentes aberrations chromosomiques, cellulaires et nucléaires observées au microscope optique.

Les anomalies observées dans les quatre phases de la mitose au niveau des cellules d'*A. cepa* traitées par nos deux fractions, permettent de mettre en évidence les effets génotoxiques de ces extraits (EL-SHAHABY *et al.*, 2003 ; YUET-PING *et al.*, 2012 ; SUMITHA et THOPPIL, 2016).

Les travaux de SUNAR *et al.* (2009) ont montré que l'extrait méthanolique de *Verbascum speciosum* a causé la diminution des indices mitotiques avec une augmentation des indices d'aberrations chromosomiques. Il a été prouvé que l'extrait méthanolique de cette espèce a induit des anomalies chromosomiques dans les semences de maïs (LUCA *et al.*, 2019).

2.2.3. Illustration des principales aberrations

Le T- est représenté par l'eau distillée qui ne perturbe pas la division cellulaire. De ce fait, nous avons observé des cellules qui présentent les phases normales de la mitose qui sont illustrées dans la figure suivante.

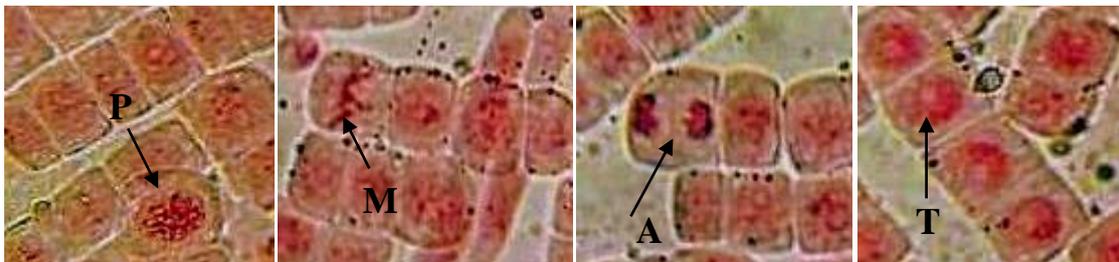


Figure 19 : Les différentes phases de la mitose vues sous microscope optique (X 40).

P : Prophase, **M** : Métaphase, **A** : Anaphase, **T** : Télaphase.

La quercétine (T+) est un flavonoïde qui perturbe la division cellulaire en engendrant différentes aberrations de la mitose. Ces principales aberrations sont illustrées dans la figure 20.

Partie expérimentale

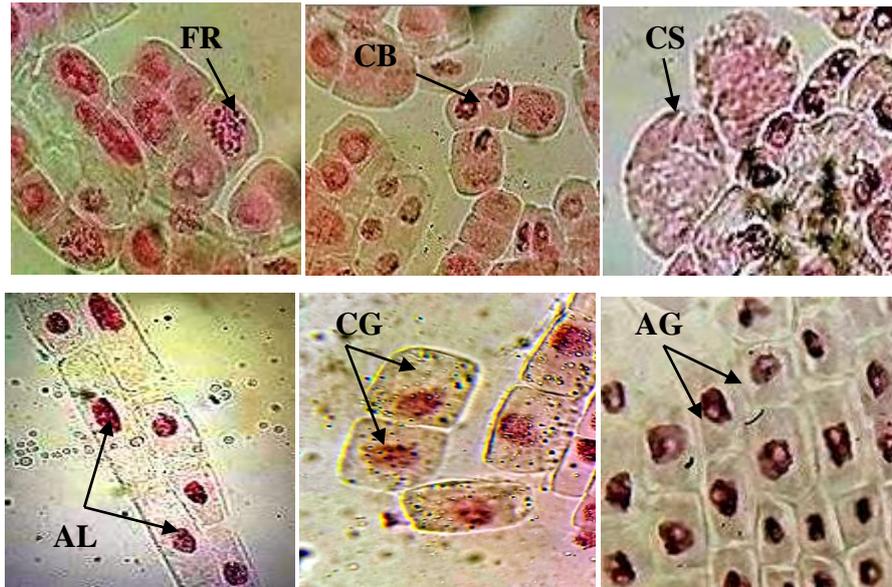


Figure 20: Aberrations chromosomiques observées sous microscope optique (X40) chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la quercétine (témoin positif).

FR : Fragmentation chromosomique, **CB :** Cellule binucléée, **CS :** Cellule sans noyaux,
AL : Allongement des cellules, **CG :** Cellules gigantesques, **AG :** Agglutinations chromosomiques.

La quercétine est un flavonoïde très commun trouvé dans de nombreuses plantes médicinales, elle possède des effets toxiques et génotoxique (SILVA *et al.*, 2002 ; SOARES *et al.*, 2006 ; ENGEN *et al.*, 2015). Elle présente une forte affinité de liaison avec l'ADN, ce qui induit des dommages au niveau de l'ADN et des chromosomes dans les cellules cancéreuses (CANTERO *et al.*, 2006). Une autre étude rapporte que la quercétine inhibe la topoisomérase II, entraînant une endoreduplication et un mouvement anaphasique inapproprié des chromosomes (CANTERO *et al.*, 2006).

La quercétine, qui est un flavonol faiblement acide et soluble dans les lipides, peut diffuser librement à travers la membrane cellulaire et s'accumuler à l'intérieur des cellules tumorales, qui sont plus basiques que le pH externe, ce qui entraîne une accumulation plus élevée dans les cellules cancéreuses (TU *et al.*, 2015). Elle comprend de nombreuses capacités anti oxydantes et anti inflammatoires. Elle inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (BOOTS *et al.*, 2008). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence des effets anticancéreux de la quercétine. Des tests *in vitro* ont révélé que la quercétine est capable d'induire une apoptose de cellules leucémiques (RUSSO *et al.*, 2007). Des études chez les rongeurs montrent des effets bénéfiques contre le cancer du sein (VERMA *et al.*, 1988), contre les mélanomes (CALTAGIRONE *et al.*, 2000) et contre le cancer du pancréas

Partie expérimentale

(MOURIA *et al.*, 2002). En ce qui concerne le cancer du côlon, la quercétine est également capable d'inhiber la néoplasie induite par l'azoxyméthane (DESCHNER *et al.*, 1991).

L'action de la fraction butanolique sur la mitose des cellules méristématiques a révélé des anomalies dans la division cellulaire. Ces anomalies représentées dans la figure 21.

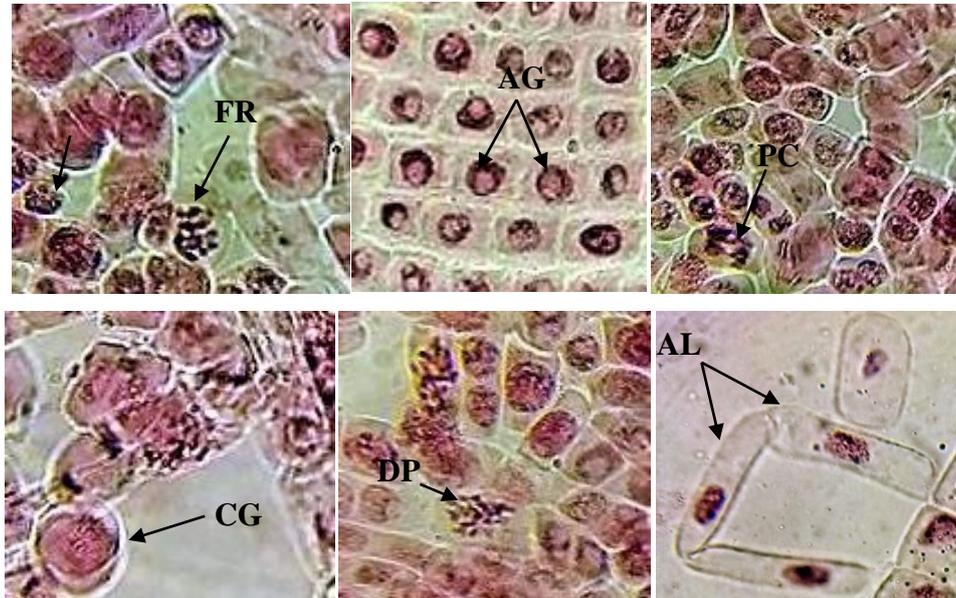


Figure 21: Aberrations chromosomiques vues sous microscope optique (X40) chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la fraction butanolique des feuilles de *V. sinuatum*.

FR : Fragmentation chromosomique, **AG :** Agglutinations chromosomiques, **PC :** Pont chromosomique, **CG :** Cellule gigantesque, **DP:** Désorganisation de la plaque équatorial lors de la métaphase, **AL :** Allongement des cellules.

L'action de la fraction aqueuse sur les cellules de bulbe d'oignon d'*A. cepa* a également provoqué des aberrations lors de la division cellulaire (figure 22).

Partie expérimentale

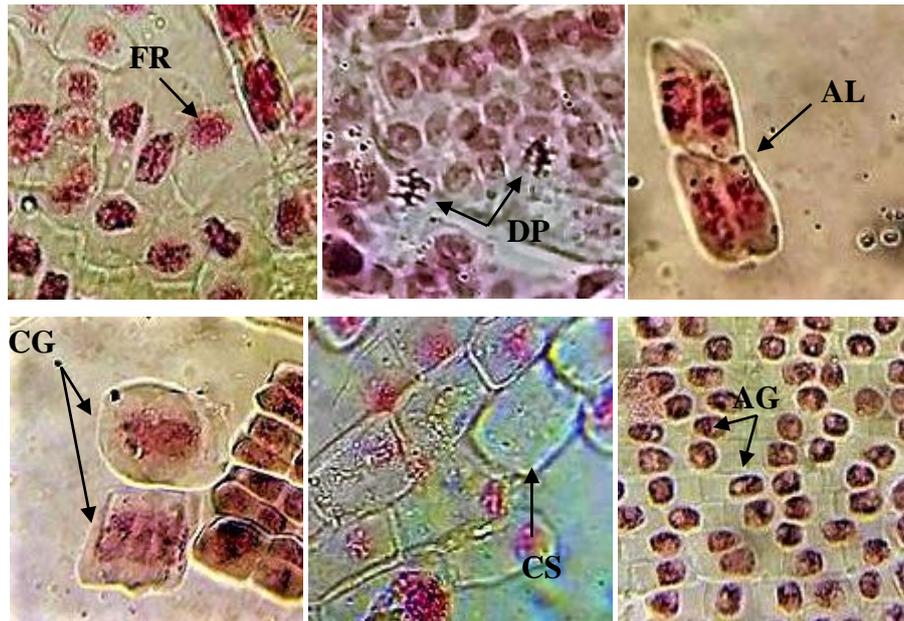


Figure 22: Aberrations chromosomiques observées sous microscope optique (X40) chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la fraction aqueuse des feuilles de *V. sinuatum*

FR : Fragmentation chromosomique, **DP :** Désorganisation de la plaque équatoriale, **AL :** Allongement des cellules ; **CG :** Cellules gigantesques, **CS :** Cellules sans noyaux, **AG :** Agglutinations chromosomiques.

Les différents extraits foliaires ainsi que le T+ ont été capables d'induire des anomalies chromosomiques au niveau des cellules d'*A. cepa*, alors que ces aberrations n'ont pas été détectées au niveau du control négatif. La réduction de l'IM pourrait être expliquée comme étant due à l'obstruction de l'apparition de la prophase, l'arrêt d'une ou de plusieurs phases mitotiques, ou le ralentissement du taux de progression cellulaire durant la mitose (YUET-PING *et al.*, 2012) entraînant une diminution du nombre de divisions des cellules (SHARMA et VIG, 2012).

AKANEME et AMAEFULE (2012) ont signalé que les lésions nucléaires peuvent être dues à l'action inhibitrice de composés phytochimiques sur la biosynthèse de l'ADN. La fragmentation des chromosomes ou de la chromatine est due à des ruptures au niveau des sites fragiles. LUKUSA et FRYNS (2008) affirment que les changements apportés dans la viscosité du cytoplasme sont responsables d'aberrations chromosomiques.

FISKESJO (1993) suggère que les cassures chromosomiques sont associées à la formation de fragments chromosomiques. Les fragmentations du noyau des cellules méristématiques d'*A. cepa* laisse suggérer qu'il s'agit de nécrose qui est une mort cellulaire dite accidentelle (MOREAU, 2006).

Partie expérimentale

Il a été démontré que l'effet dit de « stikness » (tendance à l'agglutination) serait le résultat de la condensation de l'ADN (OSTERBERG *et al.*, 1985) et l'étranglement des fibres chromatidiques (PATIL et BHAT, 1992).

Les ponts chromosomiques lors de l'anaphase pourraient être provoqués durant la translocation d'échange chromatidiques inégal ou à la présence de chromosomes dicentriques (KONUK *et al.*, 2007). Les ponts chromosomiques peuvent également être causés par la viscosité et le caractère collant des chromosomes qui fait que leur séparation est incomplète, ils restent donc reliés par des ponts (JABEE *et al.* 2008 ; HOSEINY-RAD *et al.*, 2011).

La présence de cellules binucléées laisse suggérer qu'elles sont probablement dues à l'inhibition de la cytokinèse à n'importe quel point du contrôle du cycle cellulaire (ATEEQ *et al.*, 2002). En général elles sont dues à un trouble dans la formation du fuseau mitotique (TURKOGU, 2008).

En ce qui concerne les cellules comprenant un noyau volumineux, on pense qu'il s'agit d'une polyploïdie. C'est 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 (DELCOURT et DEYSSON, 1976).

La perturbation de la plaque métaphasique peut être le résultat de la perturbation du fuseau mitotique ou en raison d'une inhibition de se dernier (HSIEH *et al.*, 2012 ; CUYACOT *et al.*, 2014 ; TRIPATHY et RAO, 2015).

2.2.4. La valeur limite de cytotoxicité

Pour mettre en évidence l'importance des aberrations engendrées par les différents agents testés à savoir la quercétine, la fraction aqueuse et la fraction butanolique, nous avons déterminé la valeur limite de cytotoxicité (VLC) qui représente le rapport entre les indices mitotiques des cellules traitées sur les indices mitotiques des cellules témoins fois 100 (tableau V).

Tableau V: Valeurs limites de cytotoxicité.

	IM (% ± ES)	VLC (% ± ES)
T+	44,4 ± 0,72	48,16 ± 0,78
FB	47,2 ± 1,03	51,19 ± 1,29
FA	70 ± 0,75	75,92 ± 1,10

T+: Témoin positif (quercétine 1mg/ml), **FB:** Fraction butanolique, **FA:** Fraction aqueuse.

IM : Indice mitotique, ES : Erreur standard, VLC : Valeur limite de cytotoxicité.

Partie expérimentale

Les cellules méristématiques traitées avec la fraction aqueuse présentent l'IM le plus élevé qui est de $70 \pm 0,75\%$ ce qui provoque l'augmentation de la valeur limite de cytotoxicité ($75,92 \pm 1,10\%$). Contrairement au T+ dont l'IM est le plus faible ($44,4 \pm 0,72$) ce qui engendre la diminution de la VLC à un pourcentage de $48,16 \pm 0,78\%$. Quant à la fraction butanolique, cette dernière comprend un IM et une VLC qui se rapprochent de celles du T+ dont les valeurs sont $47,2 \pm 1,03\%$ et $51,19 \pm 1,29\%$ respectivement.

Le niveau cytotoxique peut être déterminé par le taux de diminution des IM. La diminution en dessous de 22% du contrôle négatif cause des effets létaux sur l'organisme d'essai (ANTONSIE-WIEZ, 1990), alors qu'une diminution inférieure de 50% a des effets sublétaux (SHARMA et VIG, 2012) et est appelée valeur limite cytotoxique. Selon ces deux définitions on pourra déduire que la fraction butanolique est sublétales pour les cellules racinaires d'*Allium cepa*, de même pour le T+ représenté par la quercétine.

L'étude statistique type ANOVA de la VLC a révélé que la fraction butanolique est plus toxique que la fraction aqueuse. En effet, la fraction butanolique ne présente pas de différence significative avec la quercétine ($P > 0,05$) et présente une différence hautement significative avec la fraction aqueuse ($P = 0,00$) (annexe 2). D'après ces résultats on peut déduire que les fractions flavonoïques foliaires de *Verbascum sinuatum* L. ont des effets antimitotiques et cytotoxiques différents sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa*.

Des études ont montré que beaucoup de flavonoïdes qui peuvent prévenir le cancer, ont la capacité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire (RAFFA *et al.*, 2017). AFIFI *et al.* (1993) ont isolé quatre flavonoïdes, à savoir chrysoériol, hydrocarpine, lutéoline et sinaïticine à partir de la fraction acétate d'éthyle de feuilles de *Verbascum sinaïticum*. Cette fraction a révélé une cytotoxicité sur les cellules leucémique lymphocytaire P-388.

Les effets de *Verbascum pynostachyum*, de *Verbascum cheiranthifolium*, *Verbascum Asperulum* et d'extraits de méthanol de *Verbascum orgyale* ont été évalués sur des cellules HeLa (lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus humain). Après 24 heures d'incubation avec chaque extrait, les résultats obtenus indiquent que tous les genres *Verbascum* réduisent la viabilité cellulaire des cellules HeLa (LI *et al.*, 2014 ; RAFFA *et al.*, 2017). Les effets cytotoxiques de plusieurs espèces de *Verbascum* ont également été signalés dans différents types de lignées de cellules tumorales. Les extraits de *Verbascum ovalifolium* ont diminué la viabilité des cellules du mélanome malin SK MEL 2 (lignée cellulaire de mélanome humain) (LUCA *et al.*, 2019).

Partie expérimentale

RUSSO *et al.* (2014) ont rapporté l'activité inhibitrice de la topoisomérase de certains flavonoïdes. Cependant, MAZUMDAR *et al.* (2011) indique que les médicaments capables d'inhiber l'activité de ces enzymes sont de bons candidats en tant qu'anticancéreux. Le pinostrobin, un flavonoïde naturel présent dans certaines plantes, notamment le *pandurate de Kaempferia* et *Cajanus cajan* agit comme un antagoniste de l'ADN-topoisomérase I.

2.3. Evaluation de l'effet des fractions flavonoïques sur la membrane érythrocytaire

Dans le but d'évaluer l'effet de la fraction aqueuse et butanolique sur l'intégrité membranaire des érythrocytes, nous avons déterminé le pourcentage d'hémolyse lié à l'action de ces fractions sur les globules rouges résumée dans le tableau suivant :

Tableau VI: Pourcentage d'hémolyse des extraits flavonoïques.

	T-	T+	FB	FA
DO (nm)	0,031	1,9	1,7	1,7
Hémolyse (%)	1,63 ± 0,00	100 ± 0,00	87,84 ± 0,00	87,84 ± 0,00

T- : Témoin négatif (eau physiologique), **T+**: Témoin positif (saponine), **FB**: Fraction butanolique, **FA**: Fraction aqueuse, **DO** : Densité optique.

Le T- qui est représenté par de l'eau physiologique dont le pourcentage d'hémolyse est 1,63±0,00%, n'a presque aucun effet sur les globules rouges. Contrairement au T+ qui est la saponine, un composé tri terpénique fortement hémolytique qui présente 100±0,00% d'hémolyse. On remarque également que nos deux fractions flavonoïques présente 87,84±0,00% d'hémolyse.

SUWALSKY *et al.* (2008) suggèrent que malgré le fait que les membranes des érythrocytes soient moins spécialisées que les autres membranes cellulaires, elles remplissent suffisamment de fonctions communes, telles que le transport actif et passif et la production de gradients ioniques et électriques, de ce fait elles peuvent être considérées comme représentatifs de la membrane plasmique en général.

Les données *in vitro* de DUCHNOWICZ *et al.* (2012) montrent que les flavonoïdes de chou rouge (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) et de chou de Bruxelles (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) affectent directement les membranes érythrocytaires. Ses composés réduisent la concentration du cholestérol dans les érythrocytes hypercholestérolémiques. L'influence de l'extrait de chou rouge sur la concentration en cholestérol et l'activité de l'ATPase est probablement liée aux effets des anthocyanes (ONTIVEROS *et al.*, 2019).

Partie expérimentale

Dans le cas des flavonoïdes, le mode d'interaction membranaire a été principalement attribué à leur lipophilie et à leur structure plane (VAN-DIJK *et al.*, 2000). Le nombre et la position des groupes hydroxyle ont une influence sur le pouvoir hydrophobe relatif de différents flavonoïdes (POKLAR-ULRIH *et al.*, 2010). VAN-DIJK *et al.* (2000) ont signalé que les flavonoïdes se localisent dans le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique ou à l'interface membranaire, ce qui entraîne des modifications de la fluidité ou de la rigidité de la membrane. La flavone chrysrine pénètre plus profondément dans la couche hydrophobe de la membrane par rapport à la flavonone lutéoline, localisée principalement en surface (POKLAR-ULRIH *et al.*, 2010).

L'étude de PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al.* (2003) a montré que la quercétine affectait grandement la membrane lipidique des érythrocytes par une augmentation des interactions protéine-protéine. D'autres rapports sur la quercétine suggèrent qu'elle induit une rigidité de la membrane (CHAUDHURI *et al.*, 2007 ; TSUCHIYA, 2010). Cet effet de rigidité est directement lié à la cytotoxicité des flavonoïdes sur les cellules cancéreuses du sein (SELVARAJ *et al.*, 2015).

Conclusion

La présente étude a concerné l'évaluation *in vitro* de l'effet antimitotique et cytotoxique des fractions de flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. L'activité antimitotique a été évaluée par les observations au microscope optique des cellules méristématiques d'*Allium cepa*, traitées avec nos fractions flavonoïques et le calcul de différents indices.

Nos résultats ont révélé que nos deux fractions sont riches en flavonoïdes de part leur concentration qui est de $95,4 \pm 0,01$ µg EQ/ml de fraction pour la fraction butanolique et de $97,7 \pm 0,02$ µg EQ/ml de fraction pour la fraction aqueuse. De plus nous avons constaté que la fraction butanolique dont l'indice mitotique est de $47,20 \pm 1,03\%$ provoque un effet antimitotique, génotoxique et mitodépresseur dans les cellules méristématiques d'*A. cepa* plus important que la fraction aqueuse. L'indice de phase est représenté essentiellement par des prophases pour toutes les fractions et témoins testés. Nous avons également constaté que la fraction butanolique présente l'indice d'aberration le plus élevé avec un total atteignant $26,51 \pm 8,06\%$ d'anomalies. Cependant, les altérations chromosomiques, cellulaires et nucléaires les plus identifiées sont les agglutinations, les fragmentations ainsi que l'absence de cytodièrese. Enfin grâce au calcul de la valeur limite de cytotoxicité nous sommes arrivés à la conclusion que la fraction butanolique est sublétales.

L'effet sur l'intégrité membranaire érythrocytaire humaine a aussi été évalué par spectrophotométrie. Les résultats ont révélés un taux d'hémolyse élevé et cela pour les deux fractions flavonoïques butanolique et aqueuse. Il résulte de l'action des flavonoïdes sur les membranes érythrocytaires.

La recherche actuelle a révélé que les composés flavonoïques sont d'excellents acteurs dans le traitement de la croissance cellulaire. En perspective il serait intéressant de tester l'action de ces molécules bioactives sur le modèle animal et des lignées de cellules cancéreuses. Il serait également très intéressant aussi d'identifier la nature de ces molécules par des techniques de haute performance comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), la spectroscopie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

AFIFI M.S.A., AHMED M.M., J.M. PEZZUTO et KINGHORN A.D. (1993). Cytotoxic flavonolignans and flavones from *verbascum sinaiticum* leaves. *Phytochemistry*, 34 (3), 839-841.

AHMAD W., SHAIKH S., NAZAM N. et LONE M.I. (2014). Protective Effects of Quercetin against Dimethoate-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in *Allium sativum* Test. *International Scholarly Research Notices*, 227, 1-6.

AICHE IRATNI G., MOUALEK I., MESTAR GUECHAOUI N., MEZAACHE AICHOOR S., ZERROUG M. M. et HOUALI K. (2015). *In vitro* evaluation of biological activities of *pistacia lentiscus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(11), 133-139.

AKANEME F.I. et AMAEFULE C.C. (2012). Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of *Azardirachta indica* A. Juss. using the *Allium* test. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 3898-3907.

AKINBORO A. et BAKARE A.A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470-475.

ALILOU H., BENCHARKI B., HASSANI L.M.I. et BARKA N. (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus*. *Afrique Science*, 10 (3), 316-328.

ALIPIEVA K.I., ORHAN I.E., CANKAYA I.I.T., KOSTADINOVA E.P. et GEORGIEV M.I. (2014). Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochemistry Reviews*, 13 (2), 417-444.

ANTONSIE-WIEZ 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.

ARMAH C.N., MACKIE A.R., ROY C., PRICE K., OSBOURN A.E., BOWYER P. et LADHA S. (1999). The Membrane-Permeabilizing Effect of Avenacin A-1 Involves the Reorganization of Bilayer Cholesterol. *Biophysical Journal*, 76 (1), 281- 290.

ARMATU A., BODIRLAU R., NECHITA C. B., NICULAU M., TEACA C. A., ICHIM M. et SPIRIDON I. (2011). Characterization of biological active compounds from *Verbascum phlomoides* by chromatography techniques. I. Gas chromatography. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (4), 6297-6304.

ATEEQ B., ABUL FERAH M., NIAMAT ALI M. et AHMAD W. (2002). Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*, 514, 105-114.

AUGUSTIN J.M., KUZINA V., ANDERSEN S.B. et BAK S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72 (6), 435-457.

Références bibliographiques

AVIGNON A., LAMBERT K. et BISBAL C. (2010). Thé, chocolat, raisin...ou les polyphénols comme outils de prévention du diabète de type 2. *Mise au point cliniques d'endocrinologie*, 125-136.

BADR A., GHAREEB A. et EL-DIN H.M. (1992). Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells os *vicia faba* roots. *Egyptian Journal of Applied Sciences*, 7, 457-468.

BARASOAIN I., GARCIA-CARRIL A.M., MATESANZ R., MACCARI G., TRIGILI C. et MORI M. (2010). Probing the Pore Drug Binding Site of Microtubules with Fluorescent Taxanes: Evidence of Two Binding Poses. *Chemistry & Biology*, 17 (3), 243-253.

BEKKARA F., JAY M., VIRICEL M. R. et ROME S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 203 (1), 27–36.

BHUJBAL S.S., DESHMUKH R.P., BIDKAR J.S., THATTE V.A., AWASARE S.S. et GARG P.P. (2011). Evaluation of cytotoxicity activity of barks of *Mimosops elengi*. *Eurasian Journal of Biosciences*, 5 (1), 73-79.

BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. et TROGOLO C. (1980). 6-O-β-D-Xylopyranosylaucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, 19 (4), 571-573.

BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. et TROGOLO C. (1981). 6-O-α-Sinuatosylaucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, 20 (3), 465-468.

BOOTS A.W., HAENEN G.R. et BAST A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585 (2-3), 325-337.

BOUZID W., YAHIA M., ABDEDDAIM M., ABERKANE M.C. et AYACHI A. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'*Aubepine monogyne*. *Lebanese Science Journal*, 12 (1), 59-69.

BRADLEY P. (2006). British Herbal Compendium. Volume 2: a handbook of scientific information of widely used plant drugs. Edition British Herbal Medicine Association. ISBN 0903032120. Bournemouth, Grande-Bretagne, Royaume-Uni.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes Médicinales – 3ème Edition Techniques et documentations. Paris. ISBN 2-7430-0315-4.

CALTAGIRONE S., ROSSI C., POGGI A., RANELLETTI F.O., NATALI P.G., BRUNETTI M., AIELLO F.B. et PIANTELLI M. (2000). Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International Journal of Cancer*, 87(4), 595-600.

CANTERO G., CAMPANELLA C., MATEOS S. et CORTES F. (2006). Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis*, 21 (5), 321-325.

Références bibliographiques

CARAZO-SALAS R.E et BRUNET S. (2002). Assemblage du fuseau de division : le secret des chromosomes. *Médecine Science*, 18 (12), 1219-1226.

CAUDRON F. (2007). Des microtubules détyrosinés : quelles conséquences pour la cellule. Thèse de doctorat. Université de JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1. France.

CHAUDHURI S., BANERJEE A., BASU K., SENGUPTA B. et SENGUPTA P.K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins : Antioxydant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 42–48.

CHEESMAN I.M. et DESAI A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface. *Molecular Cell Biology*, 9, 33-46.

COWAN N.M. (1999). Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.

CUYACOT A.R., MAHILUM J.J.M. et MADAMBA M.R.S.B. (2014). Cytotoxicity potentials of some medicinal plants in Mindanao, Philippines. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 4, 81-89.

DABYDEEN A.D., BURNETT J.C., BAI R., VERDIER-PINARD P., BLUNT J.W., GUSSIO R., HICKFORD S.J.H., PETTIT G.R., MUNRO M.H.G., FLORENCE G., PATERSON I. et HAMEL E. (2006). Comparison of the Activities of the Truncated Halichondrin B Analog NSC 707389 (E7389) with Those of the Parent Compound and a Proposed Binding Site on Tubulin. *Molecular Pharmacology*, 70 (6), 1866-1875.

DANCHUL T.Y., KHANIN V.A., SHAGOVA L.I. et SHAVARDA A.L. (2007). Flavonoids of some species of the genus *Verbascum* (Scrophulariaceae). *Rastitel'nye Resursy*, 43, 92-102.

DANE F. et YILMAZ G. (2009). A new natural hybrid of *Verbascum* (Scrophulariaceae) from European Turkey. *Phytologia Balcanica*, 15 (2), 181-184.

DELAUNAY J. et BOIVIN P. (1990). Le squelette du globule rouge. *La Recherche*, 223 (21), 845-852.

DELCOURT A. et DEYSSON G. (1976). Effets de la Trifluraline sur les Meristemes Radiculaires d'*Allium sativum* L. *Cytologia*, 41, 75-84.

DEMNATI F. et ALLACHE F. (2014). Effect of *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae) on oviposition of *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae). *Journal of Crop Protection*, 3 (3), 327-334.

DESCHNER E.E., RUPERTO J., WON G. et NEWMARK H.L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12 (7), 1193-1196.

Références bibliographiques

DIAZ J.F. (2000). Molecular Recognition of Taxol by Microtubules. Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (34), 26265-26276.

DIAZ J.F. (2003). Fast Kinetics of Taxol Binding to Microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (10), 8407-8419.

DIAZ J.F., BARASOAIN I., SOUTO A.A., AMAT-GUERRI F. et ANDREU J.M. (2005). Macromolecular Accessibility of Fluorescent Taxoids Bound at a Paclitaxel Binding Site in the Microtubule Surface. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (5), 3928-3937.

DJERROUMI A. et NACEF M. (2016). 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Houma, ISBN. 978-9961-65-623-5, Alger.

DRANDAROV K. et HAIS I.M. (1997). Separation of EZ isomeric macrocyclic spermine alkaloids of *Verbascum pseudonobile* and *Verbascum phoeniceum* and of their derivatives using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, 724 (1-2), 416-423.

DUCHNOWICZ P., BORS M., PODSEDEK A., KOTER-MICHALAK M. et BRONCEL M. (2012). Effect of polyphenols extracts from Brassica vegetables on erythrocyte membranes (*in vitro* study). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34 (3), 783-790.

EDZIRI H., MASTOURI M., CHERAIF I. et AOUNI M. (2010). Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. *Natural Product Research*, 24 (9), 789-796.

EL-SHAHABY O.A., ABDEL-MIGID H.M., SOLIMAN M.I. et MASHALY I.A. (2003). Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6, 23-28.

EL-GHAMERY A.A., EL-NAHAS A.I et MANSOUR M.M (2000). The action of atrazine herbicide as indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65(3), 277-287.

ENGEN A., MAEDA J., WOZNIAK D., BRENTS C. A., BELL J.J., UESAKA M., AIZAWA Y. et KATO T.A. (2015). Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 785, 15-22.

EPSIE M., EXTRA J.M., COTTU P.H., CURVIER C. et MARTY M. (1998). Médicaments anticancéreux. In « Pharmacologie » : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques / SCHORDERET M., 3ème édition. Frison-Roche Paris. ISBN 2-87671-276-8.

EVANS E.A. et FUNG Y.C. (1972). Improved measurements of the erythrocyte geometry. *Microvascular Research*, 4 (4), 335-347.

Références bibliographiques

EVAN W.C. (2002). Trease and Evan-Pharmacognosy 15^{ème} ed. W.B. Sanders Company Limited.

FEKNOUS S., SAIDI F. et MOHAMED SAID R. (2014). Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature et Technologie*, 11, 7-13.

FIELD J.J., DIAZ J.F. et MILLER J.H. (2013). The Binding Sites of Microtubule-Stabilizing Agent. *Chemistry and Biology*, 20 (3), 301-315.

GARRETT R.H et GRISHAM C.M. (2000). Biochimie. 2^{ème} Edition, De Boeck, USA. ISBN 2744500208.

FISKESJO G. (1993). The *Allium cepa* in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8, 291-298.

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

GIGANT B., WANG C., RAVELLI R.B.G., ROUSSI F., STEINMETZ M.O. et CURMI P.A. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, 435 (7041), 519-22.

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

GUERITTE et FAHY. (2005). The vinca alkaloids. In « Anticancer Agents from Natural Products », edited by Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Chapter 7. 23.

HACHED K., XIE S.Z., BUFFIN E., CLADIÈRE D., RACHEZ C., SACRAS M., SORGER P.K. et WASSMANNK. (2011). Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development*, 138, 2261-2271.

GURIB-FAKIM A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.

HANAOKA F. et SUGASAWA K. (2016). DNA replication, recombination, and repair: Molecular mechanisms and pathology. eBook, 1^{ère} Edition, Springer Japan. ISBN 978-4-431-55873-6.

HENNEBELLE T., SAHPAZ S. et BAILLEUL F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Pharmacologie*, 1, 3-6.

Références bibliographiques

HERBERT M., KALLEAS D., COONEY D., LAMB M. et LISTER L. (2015). Meiosis and Maternal Aging: Insights from Aneuploid Oocytes and Trisomy Births. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(4), 1-20.

HERNANDEZ-OCHOA L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat. Institut national polytechniques, Toulouse. France. 255p.

HOSEINY-RAD M., AIVAZI A.A. et JAGANNATH S. (2011). Cytogenetic and biochemical effects of Imazethapyr in wheat (*Triticum durum*). *Turkish Journal of Biology*, 35, 663-670.

HSIEH Y.J., YANG M.Y., LEU Y.L., CHEN C., WAN C.F., CHANG M.Y., CHANG C.J. (2012). *Kalanchoe tubiflora* extract inhibits cell proliferation by affecting the mitotic apparatus. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12, 149.

IKEDA K., PANT B., MISHIRO A., OZAWA K., MASUJINA T. et SUGIYANA M. (2000). A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90 (5), 574-576.

JABEE F., ANSARI M.Y.K. et SHAHAB D. (2008). Studies on the effect of maleic hydrazide on root tip cells and pollen fertility in *Trigonella foenum-graecum* L. *Turkish Journal of Biology*, 32, 337-344.

JANGALA M., MANCHE S., MUDIGONDA S., RAJA M.K., SANGRAS B.R. et KONAGURTU V. (2012). Evaluation of cytotoxicity of atenolol in *Allium cepa* L. *International Journal of Toxicol and Applied Pharmacology*, 2, 18-24.

JARADAT N., MASSOUD B. et ABU-HADID M. (2015). Screening Antibacterial and Antifungal Activities and Evaluation of the Exhaustive Extractions Yields For *Verbascum sinuatum*. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 6 (1), 105-110.

JORDAN A., HADFIELD J.A., LAWRENCE N.J. et MCGOWN A.T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: Agents which interact with the mitotic spindle. *Medicinal Research Review*, 18(4), 259-296.

JORDAN M.A., TOSO R.J., THROWER D. et WILSON L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9552-9556.

KALININA S.A., ELKINA O.V., KALININ D.V., SYROPYATOV B.Y., et DOLZHENKO A.V. (2014). Diuretic activity and toxicity of some *Verbascum nigrum* extracts and fractions. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 191-198.

KALITSIS P., ZHANG T., MARSHALL K.M., NIELSEN C.F. et HUDSON D.F. (2017). Condensin, master organizer of the genome. *Chromosom Research*, 25(1), 61-76.

KANSOLE M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown,

Références bibliographiques

Hoslundia opposita vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire du Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

KAPOOR T.M., MAYER T.U., COUGHLIN M.L. et MITCHISON T.J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *The Journal of Cell Biology*, 150, 975-988.

KEBIECHE M., LAKROUN Z., MRAÏHI Z. et SOULIMANI R. (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, 9 (5), 1-9.

KEUKENS E.A.J., VRIJE T., BOOM C., WAARD P., PLASMAN H.H., THIEL F., CHUPIN.V., JONGEN W.M.F. et KRUIJFF B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1240 (2), 216-228.

KINGSTON D.J. (2009). Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *Journal of Natural Products*, 72 (3), 507-515.

KOBLICOVA Z., TURECEK F., NINOVA P., TROJANEK J. et BLAHA K. (1983). Verbaskine, a macrocyclic spermine alkaloid of a novel type from *Verbascum pseudorobile* Stoj. and Stef. (Scrophulariaceae). *Tetrahedron Letters*, 24 (40), 4381-4384.

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

KOZAN E., TATLI I.I., KAHRAMAN C., AKKOL E.K. et AKDEMIR Z. (2011). The *in vivo* anthelmintic efficacy of some *Verbascum* species growing in Turkey. *Experimental Parasitology*, 129 (2), 211-214.

KOZLOWSKA A. et SZOSTAK-WEGIEREK D. (2014). Flavonoids-food sources and health benefits. *Annals of the National Institute of Hygiene*. ISSN 2451-2311, 65(2), 79-85. Pologne.

KRIEF S. (2004). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris, France.

LATHA P.G., CHANDRALEKHA C.T., VILASINI G. et PANIKKAR K.R. (1998). Effects of the flower extract of *Ixoracoccinea* Linn. on the meristematic cells *Allium cepa*. *Ancient Science of Life*, 17 (4), 262-267.

LI Y., WANG S., XIA W., RAHMAN K., ZHANG Y., PENG H., ZHANG H. et QIN L. (2014). Effets de Tatariside G isolé de racines de *Fagopyrum tataricum* sur l'apoptose dans le cancer du col utérin chez l'homme. *Molecules*, 19, 11145 – 11159.

Références bibliographiques

LUCA S.V., MIRON A., APROTOSOAI A.C., MIHAI C-T., VOCHITA G., GHERGHEL D., CIOCARLAN N. et SKALICKA-WOZNIAK K. (2019). HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS profiling of *Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims and evaluation of its antioxidant and cytogenotoxic activities. *Phytochemical Analysis*, 30, 34-45.

LUKUSA T. et FRYNS J.P. (2008). Human chromosome fragility review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779, 3-16.

MACHEIX J.J., FLEURIET A., et JAY-ALLEMAND C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. ISBN 2-88074-925-6. Italie.

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

MARTIN S. et ANDRIANTSITOHAINA R. (2002). Mécanisme de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 (6), 304-315.

MAYER T.U., KAPOOR T.M., HAGGARTY S.J., KING R.W., SCHREIBER S.L. et MITCHISON T.J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, 286, 971-974.

MAZUMDAR M., GIRI S. et GIRI A. (2011). Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations *in vivo*. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721 (2), 147-152.

MEIJER L., KNOCKAERT M. et DAMIENS E. (2001). Prévention par un inhibiteur de kinases cyclines-dépendantes, de l'alopécie induite par la chimiothérapie. *Bulletin du cancer*, 88 (4), 347-350.

MIHAILOVIC V., KREFT S., TAVCAR-BENKOVIC E., IVANOVIC N. et STANKOVIC M. S. (2016). Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Industrial Crops and Products*, 89, 141-151.

MOREAU D. (2006). Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse de Doctorat. Université de Nantes. France. P.321.

MOURIA M., GUKOVSKAYA A.S., JUNG Y., BUECHLER P., HINES O.J., REBER H.A. et PANDOL S.J. (2002). Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *International Journal of Cancer*, 98(5), 761-769.

MUNIZ M.N. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (±) anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble I. P: 11-29.

Références bibliographiques

MURRAY K.R., BENDER D.A., BOTHAM K.M., KENNELLY P.J., RODWELL V.W. et WEIL P.A. (2011). Muscle et cytosquelette in *Biochimie de Harper*, 4^{ème} Edition chapitre 49, P 545-565. Editions DE Boeck, ISBN 978-2-8041-6223-8, Bruxelles.

NEGI A.S., GAUTAM Y., ALAM S., CHANDA D., LUGMAN S., SARKAR J., KHAN F. et KONWAR R. (2015). Natural antitubulin agents: Importance of 3, 4, 5 - trimethoxyphenyl fragment. *Bioorganic et Medicinal Chemistry*, 23(3), 373-389.

NOFOUZI K. (2015). Study on the antioxidant activity and *in vitro* antifungal activity of *Verbascum speciosum* methanolic extract. *Journal of Mycology Research*, 2 (2), 97-103.

NOGALES E., WHITTAKER M., MILLIGAN R.A., DOWNING K.H. (1999). High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell Press*, 96(1), 79-88.

NORBURY C. et NURSE P. (1992). Animal Cell Cycles and Their Control. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 441-468.

OLIVEIRA R., HAMILTON R.S., PAULI A., DAVIS I. et NASMYTH K. (2010). Cohesin cleavage and CdK inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nature Cell Biology*, 12, 185-192.

ONTIVEROS M., RINALDI D., MARDER M., ESPELT M.V., MANGIALAVORI I., VIGIL M., ROSSI J.P. et FERREIRA-GOMEZ M. (2019). Natural flavonoids inhibit the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1-11.

OSTERBERG R., PERSSON D. et BJURSELL G. (1985). The condensation of DNA by Chromium (III) ions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2, 285-290.

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

PATEL K., SINGH R.B. et PATEL D.K. (2013). Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 92-98.

PATIL B.C. et BHAT J.I. (1992). A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternata* L. *Cytologia*, 57, 259-264.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA B., GRUSZECKI W.I., MISIAK L.E. et GAWRON A. (2003). The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemichal Pharmacology*, 66(4), 605-612.

POKLAR-ULRIH N., OTA A., ŠENTJURC M., KURE S. et ABRAM V. (2010). Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry*, 121 (1), 78-84.

Références bibliographiques

RADJENDRA K., JGAR B. et PRITI D. (2015). Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its herbal formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 17 (10), 249-251.

RAHEEL R., SADDIQA Z., IRAM M. et AFZAL S. (2017). *In vitro* antimutagenic, antiproliferative and antioxidant activity of stem bark extracts of *Ficus benghalensis* L. *South African Journal of Botany*, 111, 248-257.

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

RAFFA D., MAGGIO B., RAIMONDI M.V., PLESCIA F. et DAIDONE G. (2017). Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 213-228.

RAVELLI R.B.G., GIGANT B., CURMI P.A., JOURDAIN I., LACHKAR S. et SOBEL A. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. 428(6979), 198-202.

REMAL P.S. (2014). Approche moléculaire et morphologique du genre *Verbascum* L. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. Toulouse. France.

ROBERT J. (2007). Les poisons du fuseau. *Oncologie*, 9 (11), 766-772.

ROSENBLATT J. (2005). Spindle assembly: Asters part their separate ways. *Nature Cell Biology*, 7(3), 219-222.

RUSSO M., NIGRO P., ROSIELLO R., D'ARIENZO R. et RUSSO G.L. (2007). Quercetin enhances CD95 and TRAIL induced apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia*, 21 (5), 1130-1133.

RUSSO M., SPAGNUOLO C., BILOTTO S., TEDESCO I., MAIANI G. et RUSSO G.L. (2014). Inhibition of protein kinase CK2 by quercetin enhances CD95-mediated apoptosis in a human thymus-derived T cell line. *Food Research International*, 63, 244-251.

SARIKAHYA N.B., NALBANTSOY A., TOP H., GOKTURK R.M., SUMBUL H. et KIRMIZIGUL S. (2018). Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine*, 38, 135-144.

SAZER S., LYNCH M. et NEEDLEMAN D. (2014). Deciphering the Evolutionary History of Open and Closed Mitosis. *Current Biology*, 24 (22), 1099-1103.

SCHIFF P.B., FANT J. et HORWITZ S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277 (5698), 665-667.

SCHMID-SCHONBEIN G.W., FISHER G. et RIEGER H. (1979). Microcirculation. *Clinical Research Applications of Engineering Principles*. 333-417.

Références bibliographiques

SEHGAL R., ROY S. et KUMAR V.L. (2006). Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* podophyllotoxin in *Allium cepa* root model. *Biocell*, 30 (1), 9-13.

SELVARAJ S., KRISHNASWAMY S., DEVASHYA V., SETHURAMAN S. et KRISHNAN U.M. (2015). Influence of membrane lipid composition on flavonoid–membrane interactions: Implications on their biological activity. *Progress in Lipid Research*, 58, 1-13.

SENATORE F., RIGANO D., FORMISANO C., GRASSIA A., BASILE A., et SORBO S. (2007). Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. *Fitoterapia*, 78 (3), 244–247.

SHARMA S. et VIG A.P. (2012). Genotoxicity of atrazine, avenoxan, diuron and quizalofop-P-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberration assay. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, 6, 90-95.

SHAZIA T., SWATI K. et KIRTI J. (2016). Spectrophotometric quantification of total phenolic, flavonoid and alkaloid contents of *Abrus precatorius* L. seed. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9 (2), 371-374.

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

SILVA J.D., HERRMANN S.M., HEUSER V., PERES W., MARRONI N.P., GONZALEZ-GALLEGO J. et ERDTMANN B. (2002). Effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (7), 941-947.

SOARES E.A., VARANDA B., et RADDI B. (2006). Basal cytotoxicity and metabolic mediation of flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 835-838.

SPERANZA L., FRANCESCHELLI S., PESCE M., REALE M., MENGHINI L., VINCIGUERRA I., DE LUTIS M.A., FELACO M., et GRILLI A. (2010). Anti-inflammatory Effects in THP-1 cells Treated with Verbascoside. *Phytotherapy Research*, 24 (9), 1398-1404.

STALIKAS C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.

STOODER A. (2015). Histoire biogéographique et évolutive des genres *Verbascum* et *Artemisia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire. Thèse de doctorat. Disciplines Ecologie fonctionnelle. Université Toulouse 3 Paul Sabatier. France.

SUMITHA K.V. et THOPPIL J.E. (2016). Genotoxicity assessment of two common curing weeds: *Hypstis suaveolens* (L.) Poir. and *Leucas indica* (L.) R. Br. *Cytotechnology*, 68, 1513-1527.

Références bibliographiques

SUNAR S., AKSAKAL O., YILDIRIM N. et AGAR G. (2009). Determination of the Genotoxic Effects of *Verbascum speciosum* Schrad. Extracts on Corn (*Zea mays* L.) Seeds. *Romanian Biotechnological Letters*, 14 (6), 4820-4826.

SUWALSKY M., VARGAS P., AVELLO M., VILLENA F. et SOTOMAYOR C.P. (2008). Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristotelia chilensis* (Maqui) leaves. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, 85-90.

TANENBAUM M.E. et MEDEMA R.H. (2010). Mechanisms of Centrosome Separation and Bipolar Spindle Assembly. *Developmental Cell*, 19, 797–806.

TATLI I.I. et AKDEMIR Z.S. (2004). Chemical Constituents of *Verbascum* L. Species. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29 (2), 93-107.

TATLI I.I. et AKDEMIR Z.S. (2006). Traditional uses and biological activities of *Verbascum* species. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(2), 85-96.

TATLI I.I., KAHRAMAN C. et AKDEMIR Z.S. (2015). The Therapeutic Activities of Selected Scrophulariaceae and Buddlejaceae Species and Their Secondary Metabolites Against Neurodegenerative Diseases. Chapter 11 in « Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease ». ISBN 978-0-12-411462-3. Elsevier. 95-111.

THOMAS L. (2013). Haemolysis as influence and interference factor. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 13 (4), 95-98.

TIMOTHY O., IDU M., OLORUNFEMI D.I. et OVUAKPORIE-UVO O. (2014). Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. *South African Journal of Botany*, 91, 71-74.

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

TOMAR P., DEY Y.N., SHARMA D., WANJARI M.M., GAIDHANI S. et JADHAV A. (2018). Cytotoxic and antiproliferative activity of *kanchnar guggulu*, an Ayurvedic formulation. *Journal of Integrative Medicine*, 16, 411-417.

TRIPATHY S.K. et RAO D.A. (2015). Mitotic aberrations induced by orange red (a food additive dye) as a potential genotoxicant on root tip cells of onion (*Allium cepa* L.). *International Food and Research Journal*, 22, 383-392.

TSUCHIYA H. (2010). Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry*, 120 (4), 1089-1096.

TU B., LIU Z-J., CHEN Z-F., OUYANG Y. et HU Y-J. (2015). Understanding the structure–activity relationship between quercetin and naringenin : *in vitro*. *RSC Advances*, 5, 33058-33066.

Références bibliographiques

TURKOGLU S. (2008). Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa* L. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6):2035-2041

VAN-DIJK C., DRIESSEN A.J.M. et RECOURT K. (2000). The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology*, 60 (11), 1593-1600.

VERMA A.K., JOHNSON J.A., GOULD M.N. et TANNER M.A. (1988). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Research*, 48 (20), 5754-5758.

VERMERRIS W. et NICHOLSON R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer Dordrecht. ISBN: 1001-4020-5163-8. Pays-Bas.

WALLACE R.J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society*, 63, 621-629.

WOO K., JEONG R.B. et HAWES C.M. (2005). Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. *Biotechnology Letters*, 27, 365-374.

WU Z., NOGALES E. et XING J. (2012). Comparative Studies of Microtubule Mechanics with Two Competing Models Suggest Functional Roles of Alternative Tubulin Lateral Interactions. *Biophysical Journal*, 102 (12), 2687-2696.

XU R., FAZIO G.C. et MTSUDA S.P.T. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65(3), 261-291.

YUET-PING K., DARAH I., YUSUF U.K., YENG C. et SASIDHARAN S. (2012). Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. *Molecules*, 17 (7), 7782-7791.

ZHANG Y. et WANG Z.Z. (2008). Comparative analysis of essential oil components of three phlomis species in Qinling Mountains of China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (1), 213-217.

ZHANG Y., MA Z., HU C., WANG L., Li L. et SONG S. (2012). Saponines triterpéniques cytotoxiques des feuilles d'*Aralia elata*. *Fitoterapia*, 83, 806-811.

ZIEGLER J. et FACCHINI P.J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.

Site consulté

OMS. Aide-mémoire N°297 (Février 2006). Le cancer.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs29/fr/print.html>

Annexes

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Détermination de la teneur des fractions flavonoïques de *Verbascum sinuatum* L.

	fractions	
	butanolique	aqueuse
DO1	0,146	0,156
DO2	0,186	0,207
DO3	0,169	0,237
Moyenne	0,167±0.01	0,171±0.02

À partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine qui est la suivante : $Y=0.0175 X$. Nous avons déterminé la concentration de nos échantillons puis multiplier par l'inverse de la dilution qui est de 1/10.

Fraction butanolique : $0,167 = 0,0175X$;

$X= 95,4 \mu\text{g EQ/ml de fraction}$

Fraction aqueuse : $0,171 = 0,0175X$;

$X=97,7 \mu\text{g EQ/ml de fraction}$

EQ (équivalent quercétine)

Annexes

Annexe 2 : Les résultats des ANOVA des différents paramètres biologiques calculés.

1. Indice mitotique (IM)

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	46648,90	1	46648,90	6434,331	0,000000
T- et T+	5712,10	1	5712,10	787,876	0,000000
Erreur	58,00	8	7,25		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	65772,10	1	65772,10	8948,585	0,000000
T- et FA	1232,10	1	1232,10	167,633	0,000001
Erreur	58,80	8	7,35		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	48580,90	1	48580,90	5428,034	0,000000
T- et FB	5062,50	1	5062,50	565,642	0,000000
Erreur	71,60	8	8,95		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	20976,40	1	20976,40	4195,280	0,000000
T+ et FB	19,60	1	19,60	3,920	0,083062
Erreur	40,00	8	5,00		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	32718,40	1	32718,40	9623,059	0,000000
T+ et FA	1638,40	1	1638,40	481,882	0,000000
Erreur	27,20	8	3,40		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	34339,60	1	34339,60	6733,255	0,000000
FB et FA	1299,60	1	1299,60	254,824	0,000000
Erreur	40,80	8	5,10		

2. Indice d'aberration (IA)

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	63,0125	1	63,01250	10,20378	0,005025
T+ et FA	6,2720	1	6,27200	1,01564	0,326911
Erreur	111,1573	18	6,17541		

Annexes

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	123,7382	1	123,7382	11,76135	0,002990
T+ et FB	0,4642	1	0,4642	0,04412	0,835984
Erreur	189,3735	18	10,5208		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	74,2936	1	74,29356	10,97059	0,003876
FA et FB	10,1489	1	10,14885	1,49863	0,236664
Erreur	121,8971	18	6,77206		

3. Indice de phase (IP)

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	11771,42	1	11771,42	14,96214	0,000417
T- et T+	1419,79	1	1419,79	1,80464	0,187121
Erreur	29896,38	38	786,75		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	16515,28	1	16515,28	15,66502	0,000320
T- et FA	312,03	1	312,03	0,29597	0,589598
Erreur	40062,55	38	1054,28		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	12268,21	1	12268,21	15,09165	0,000397
T- et FB	1254,18	1	1254,18	1,54282	0,221811
Erreur	30890,71	38	812,91		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	8250,39	1	8250,395	15,05793	0,000402
T+ et FA	400,63	1	400,626	0,73119	0,397858
Erreur	20820,60	38	547,910		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	5340,95	1	5340,952	17,42299	0,000168
T+ et FB	5,13	1	5,134	0,01675	0,897716
Erreur	11648,76	38	306,546		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	8667,14	1	8667,136	15,09752	0,000396
FA et FB	315,06	1	315,058	0,54881	0,463359
Erreur	21814,92	38	574,077		

Annexes

4. Valeur limite de cytotoxicité (VLC)

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	38535,54	1	38535,54	6739,810	0,000000
T+ et FA	1931,82	1	1931,82	337,873	0,000000
Erreur	45,74	8	5,72		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	24707,86	1	24707,86	3479,392	0,000000
T+ et FB	23,38	1	23,38	3,292	0,107161
Erreur	56,81	8	7,10		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	40457,23	1	40457,23	4490,942	0,000000
FB et FA	1530,17	1	1530,17	169,856	0,000001
Erreur	72,07	8	9,01		

Annexes

ملخص

النباتات الطبية هي مصدر مهم للغاية من الجزيئات الحيوية والتي هي مصدر العديد من الأنشطة البيولوجية وهي مضادات الأكسدة ، مضادات التكاثر الخلوي ، مضادة للالتهابات ، الانحلال الخلوي و مضاد الانقسام الخلوي... إنه في هذا المنظور أننا نحن مهتمون بنبته من مناطق البحر الأبيض المتوسط التي تستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي : *Verbascum sinuatum* L. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد كمية الفلافونويد و تقييم التأثيرات المضادة للانقسام الخلوي الناجم من مستخلص البيوتانول والمائي من أوراق *Verbascum (Scrophulariaceae) sinuatum* L. باستخدام اختبار *Allium cepa* وتحديد تأثير هذا المستخلص على سلامة الغشاء الخلوي الدموي عن طريق اختبار انحلال الدم. بعد الاستخلاص بمذيبات مختلفة ذات قطبية متغيرة ، تكون محتويات الفلافونويد المقدره بواسطة الفحص اللوني 0.01 ± 95.43 و 0.02 ± 97.70 ميكروغرام مكافئ من كيرسيتين / مل من المستخلص، على التوالي لمستخلص البيوتانيول والمائي. النتائج التي تم الحصول عليها تشير إلى أن المستخلصات البيوتانولية والمائية تمنع الانقسام عن طريق تقليل المؤشرات الانقسامية في خلايا النسيج الإنشائي *Allium cepa* للبصل (47.20 ± 1.03 % لمستخلص البيوتانول و 70.00 ± 0.75 % لمستخلص المائي) مقارنة مع الشاهد السلبي (92.20 ± 1.34). وبالتالي ، وجدنا أن مؤشر الطور يتم تمثيله بشكل أساسي بواسطة الطور الأول (prophase) وأن مستخلص البيوتانيول يسبب معظم الانحرافات بمجموع 26.51 ± 8.06 %. لقد حددنا أيضًا القيمة القصوى للتسمم الخلوي بنسبة 51.19 ± 1.29 % لمستخلص البيوتانيول و الذي يؤكد أن هذا الأخير قرب المميت .نتيجة نسبة انحلال الدم الذي هو 87.84 ± 0.00 % يشير إلى أن هذه المستخلصات تحدث أيضًا تأثيرًا سامًا لخلايا غشاء كرات الدم الحمراء بسبب عمل الفلافونويد التي تحتوي عليها. هذا يبرر بعض الخصائص الطبية لهذا النبات وكذلك استخدامه في علاج السرطان.

الكلمات المفتاحية : *Verbascum sinuatum* L, مستخلص فلافونويد, مضاد الانقسام الخلوي, *Allium cepa*, تأثيرًا سام للخلايا.