

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU**

**FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOBIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



**Mémoire de Fin d'étude**  
**En vue de l'obtention du diplôme**  
**De MASTER**  
**En Sciences Biologiques**

**Option: Microbiologie Appliquée**

**Activités antimitotique et antiproliférative des extraits aqueux des**  
**feuilles et des fleurs d'*Erica arborea***

**Réalisé par :**

**MEDERREG IMANE**

**et**

**TAYEB SKOURA**

**MEMBRES DU JURY:**

**Présidente:** Mme Aiche-Iratni G.

Maitre de conférences classe B à UMMTO.

**Promoteur:** Mr Houali K.

Professeur à UMMTO.

**Co-promotrice:** Mme Ouzid Y.

Docteur à UMMTO.

**Examinatrice:** Mme Smail-Saadoun N.

Professeur à UMMTO.

**PROMOTION 2017-2018**

## ***REMERCIEMENTS***

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

- Monsieur HOUALI Karim, Professeur à la faculté des Sciences Biologiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, notre Promoteur, pour nous avoir proposé le sujet de notre mémoire et nous avoir encadré et guidé pour le réaliser, qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

- Madame OUZID Yasmina, notre Co-Promotrice, pour son orientation, ses conseils, nous la remercions pour sa disponibilité et ses encouragements continuels. Nous tenons à lui présenter l'expression de notre profond respect.

- Madame AICHE-IRATNI Ghenima, enseignante à la faculté des Sciences Biologiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury et aussi pour sa disponibilité, ses conseils ainsi que son assistance durant nos manipulations.

- Madame SMAIL-SAADOUN Noria, Professeur à la faculté des Sciences Biologiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos vifs remerciements vont également à:

- Monsieur BEN ALI Karim, Professeur Chercheur à la faculté des Sciences Médicales de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son aide précieuse.

- A tout l'effectif du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie.
- Que tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin soient remerciés.

## *DEDICACES*

*Je dédie ce modeste travail à :*

- *Mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

- *Ceux que j'aime beaucoup et qui m'ont soutenu: ma sœur MALIKA, a mes frères Nouh, Islam et Ayoub.*

- *Toute la famille MEDERREG et mes amies*

- *Mon binôme SKOURA.*

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

*IMANE*

## *DEDICACES*

*«Celui qui se perd dans sa passion a moins perdu que celui qui a perdu sa passion»*

*William Shakespeare*

*Je dédie ce modeste travail :*

- à la mémoire de toutes les victimes du cancer en Algérie.*
- à toutes les personnes atteintes et qui mènent un combat quotidien contre cette pathologie.*

*Sachez bien que Les maladies viennent à cheval et s'en vont à pied.*

*SKOURA*

## ***SOMMAIRE***

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

### ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

<b>Introduction générale</b>	<b>01</b>
I. Généralités sur <i>Erica arborea</i>	<b>02</b>
1.1. Description d' <i>Erica arborea</i>	<b>03</b>
1.2. Etude phytochimique	<b>04</b>
1.3. Activités biologiques d' <i>Erica arborea</i>	<b>07</b>
1.3.1. Activité antioxydante	<b>08</b>
1.3.2. Activité anti-inflammatoire	<b>09</b>
1.3.3. Activité antibactérienne	<b>09</b>
II. La mitose	<b>10</b>
2.1. Les différentes phases de la mitose	<b>11</b>
2.1.1. La prophase	<b>11</b>
2.1.2. La métaphase	<b>11</b>
2.1.3. L'anaphase	<b>12</b>
2.1.4. La télophase	<b>14</b>
III. Les agents antimitotiques d'origine végétale	<b>14</b>
3.1. Les taxoïdes	<b>15</b>
3.2. Les vinca-alcaloïdes	<b>16</b>
3.3. Les alcaloïdes	<b>16</b>
IV. Les molécules cytotoxiques d'origine végétales	<b>17</b>
4.1. Les flavonoïdes	<b>17</b>
4.2. Les alcaloïdes	<b>18</b>

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

I. Matériel et méthodes	19
1.1. Matériel	19
1.1.1. Matériel biologique	19
1.1.2. Matériel de laboratoire	19
1.1.3. Solvants et réactifs	19
1.1.4. Milieu de culture de <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	20
1.2. Méthodes	20
1.2.1. Préparation des extraits aqueux	20
1.2.2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antimitotique des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d' <i>Erica arborea</i> .	21
1.2.3. Mise en évidence de l'effet antiprolifératif des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d' <i>Erica arborea</i>	23
1.2.3.1. Préparation de la suspension de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.2.3.2. Test antiprolifératif	24
1.2.3.3. Préparation de la plaque	25
1.2.3.4. Lecture des densités optiques au spectrophotomètre	27
1.2.4. Analyse statistique	27
II. Résultats et discussion	28
2.1. Activité antimitotique des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d' <i>Erica arborea</i>	28
2.2. Étude de l'activité antiproliférative	37
<b>Conclusion</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>40</b>
<b>Annexes</b>	

## ***LISTE D'ABREVIATIONS***

<b>CDK:</b>	Cyclin-Dependent Kinases.
<b>CPK:</b>	Créatine phosphokinase
<b>DO:</b>	Densité optique.
<b>ERO:</b>	espèces réactives d'oxygène.
<b>ES:</b>	Erreur standard.
<b>IM:</b>	Indice mitotique.
<b>HHDP:</b>	Acide hexahydroxy diphénique.
<b>HHT:</b>	Homoharringtonine.
<b>GDP:</b>	Guanosine diphosphate.
<b>GTP :</b>	Guanosine triphosphate.
<b>MTOC:</b>	Centres organisateurs de microtubules.
<b>Témoin +:</b>	Témoin positif.
<b>Témoin -:</b>	Témoin négatif.

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>Figure 1:</b>	Différentes parties d' <i>Erica arborea</i> .	04
<b>Figure 2:</b>	Structure chimique des tanins isolés des feuilles d' <i>Erica arborea</i> .	05
<b>Figure 3 :</b>	Structures chimiques de quelques composés phénoliques isolés des fleurs d' <i>Erica arborea</i>	05
<b>Figure 4:</b>	Les différentes phases du cycle cellulaire.	10
<b>Figure 5:</b>	Représentation schématique d'une cellule en prophase.	11
<b>Figure 6 :</b>	Représentation schématique d'une cellule en métaphase.	12
<b>Figure 7(A):</b>	Représentation schématique d'une cellule au début d'anaphase.	13
<b>Figure 7(B):</b>	Représentation schématique d'une cellule à la fin d'anaphase.	13
<b>Figure 8:</b>	Représentation schématique de la télophase.	14
<b>Figure 9:</b>	Structure chimique du Taxol et ses dérivés.	15
<b>Figure 10:</b>	Composés se fixant au site des vinca-alcaloïdes.	16
<b>Figure 11 :</b>	Structures chimiques de la colchicine A et de de la Camptothécine.	17
<b>Figure 12 :</b>	Culture des bulbes et obtention des racines d' <i>Allium cepa</i>	21
<b>Figure 13:</b>	Préparation des lames microscopiques pour le test <i>Allium cepa</i> .	22
<b>Figure 14:</b>	Schéma du protocole expérimental de l'activité antimitotique.	22
<b>Figure 15 :</b>	Cellule de Malassez utilisée pour comptage des levures vue sous microscope optique	23
<b>Figure 16:</b>	Schéma du protocole expérimental du test MTT utilisant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comme modèle dans l'étude de l'activité antiproliférative des extraits des feuilles et des fleurs d' <i>Erica arborea</i>	24
<b>Figure 17:</b>	Répartition des différents extraits au niveau de la plaque lors du test antiprolifératif-MTT.	25
<b>Figure 18:</b>	Indices mitotiques des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d' <i>Erica arborea</i> .	29
<b>Figure19:</b>	Les différentes phases de la mitose rencontrées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> (X 400).	30

<b>Figure 20 :</b>	Anomalies de la mitose rencontrées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées avec la colchicine à 1mg/ml (X 400).	31
<b>Figure 21:</b>	Anomalies de la mitose rencontrées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées avec l'extrait aqueux de feuilles d' <i>Erica arborea</i> (X 400).	32
<b>Figure 22:</b>	Anomalies rencontrées chez les cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées avec l'extrait aqueux de fleurs d' <i>Erica arborea</i> (X 400).	35

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>Tableau I:</b>	Utilisations thérapeutiques d' <i>Erica arborea</i> en médecine traditionnelle.	02
<b>Tableau II:</b>	Différents métabolites secondaires isolés des parties aériennes d' <i>Erica arborea</i> .	06
<b>Tableau III :</b>	Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d' <i>Erica arborea</i> .	07
<b>Tableau IV:</b>	Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolés d' <i>Erica arborea</i> responsables de nombreuses activités biologiques.	08
<b>Tableau V:</b>	Solvants et réactifs utilisés.	20
<b>Tableau VI :</b>	Composition du mélange réactionnel du test MTT.	26
<b>Tableau VII :</b>	Indices mitotiques des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> traitées par des extraits aqueux de feuilles et de fleurs d' <i>Erica arborea</i> .	28
<b>Tableau VIII :</b>	Taux de viabilité et de mortalité de cellule de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en contact des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d' <i>Erica arborea</i> .	37

# **Introduction générale**

# INTRODUCTION GENERALE

---

Les plantes médicinales sont considérées comme des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (TEUSCHER *et al.*, 2017). Les extraits de plantes sont utilisés en médecine traditionnelle pour leur propriétés biologiques, ils représentent une source primaire pour les médicaments employés dans le traitement de diverses pathologies microbiennes, physiologiques, inflammatoires et même cancéreuses (RHATTAS, 2016).

Le cancer constitue la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 13 millions de nouveaux cas de cancer, dont 8 millions de décès, sont enregistrés chaque année à l'échelle internationale. La chimiothérapie consiste en l'administration de médicaments capables d'entraver la prolifération des cellules tumorales. Ces substances sont en général d'une grande toxicité sur les cellules saines et présentent de nombreux effets indésirables. Le retour à la phytothérapie ouvre une voie prometteuse dans le développement de nouvelles formules médicamenteuses naturelles, sans effets indésirables et dotées d'une activité anticancéreuse (MEDJEBER *et al.*, 2018).

Parmi les plantes médicinales, *Erica arborea*, appelée aussi bruyère arborescente, est une espèce indigène du bassin méditerranéen de la famille des Ericaceae, elle se développe surtout dans les lisières forestières, sur des sols pauvres et peu acides. Cette plante est dotée de vertus thérapeutiques très diverses grâce à ses propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne. Ces caractéristiques s'expliquent par sa richesse en métabolites secondaires (BANNANI *et al.*, 2009).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance et valorisation d'*Erica arborea* par évaluation:

- de l'effet antimittotique des extraits aqueux des feuilles et des fleurs sur la mitose des cellules méristématiques de l'oignon (*Allium cepa*) ;
- de l'effet cytotoxique de ces extraits aqueux sur la viabilité des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

# **Partie bibliographique**

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Généralités sur *Erica arborea*

### Introduction

*Erica arborea* est une espèce indigène du bassin méditerranéen. On la rencontre également dans les îles Canaries et les montagnes d'Afrique centrale. En Algérie, elle se trouve dans tout le Tell formant une partie importante du maquis dans les forêts du chêne liège au centre et à l'est. Elle est plus abondante dans les maquis privés d'arbres mais cela n'exclut guère sa constante présence associée au thuya et au chêne vert dans les hauts plateaux (AIT YOUSSEF, 2006 et BROSSE, 2010). Cette espèce se développe sur les landes, les talus et les lisières forestières dans des sols siliceux et peu acides mais parfois calcaires, elle ne peut pas tolérer un substrat dont le pH est inférieur à 6 (GUENDOUZE *et al.*, 2015). Connue pour son excellent charbon de bois et les pipes fabriquées à partir de ses racines, cette bruyère est également très utilisée depuis le moyen âge. En médecine traditionnelle, elle est très connue pour ses vertus thérapeutiques, à savoir, antiseptique, sédative, anti inflammatoire et antiputride (CHEVALIER, 2008 ; BENNANI *et al.*, 2009; CHIKHI, 2016 et RHATTAS, 2016). Les différentes parties d'*Erica arborea* sont utilisées pour leurs effets thérapeutiques énumérés au niveau du tableau I.

**Tableau I:** Utilisations thérapeutiques d'*Erica arborea* en médecine traditionnelle.

Maladies	Parties de la plante utilisées	Références
Infections urinaires, calculs rénaux, désintoxication de l'appareil urinaire, Pyélonéphrite	Infusion amère des sommités fleuries	(RHATTAS, 2016).
Problèmes digestifs	Infusion de fleurs	(CHIKHI, 2016).
Inflammations rhumatismales	Application locale d'une pâte à base de la poudre de feuilles	(BENNANI <i>et al.</i> , 2009).
Crise de goutte	Infusion de feuilles et de fleurs	(DERBEL, 2005).
Antiputride	Miel de la plante	(CHIKHI, 2016).
Névralgies, calmant nerveux, effet sédatif et relaxant	Macérât et infusion de fleurs	(DERBEL, 2005).
Antivenimeux	Macérât des fleurs	(RHATTAS, 2016).

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## 1.1. Description botanique D'*Erica arborea*

*Erica arborea* est souvent appelée la bruyère arborescente, la bruyère blanche ou des maures. Elle est nommée chez nous « Bouhadad », « Chandaq » ou « Akhlenj ». C'est une espèce qui a été décrite et dénommé par CARL LINNAEUS en 1753. Le nom du genre *Erica* vient du grec *ereikein* qui veut dire *brise* et fait allusion aux rameaux fragiles de la plante. Le nom d'espèce *arborea*, du latin *arbor*, signifie *arbre* et indique le caractère arborescent de la plante (BOUCHER et DOUX, 2011). La classification taxonomique de cette espèce, selon GUIGNARD (2001), est comme suit:

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous- Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Astéridées
<b>Ordre</b>	Ericales
<b>Famille</b>	Ericaceae
<b>Genre</b>	<i>Erica</i>
<b>Espèce</b>	<i>Erica arborea</i>

*Erica arborea* est un *arbuste* au port haut et étroit, atteignant de 1 à 4 m de hauteur, pour 40 à 60 cm de large. Bien ramifiés (figure 1A), ses branches se tiennent verticales et portent de fines feuilles vertes, persistantes, ressemblant à des aiguilles, très denses et verticillées par 3 ou 4. Elles sont longues de 4 à 8 mm et creusée d'un sillon sur leur face inférieure (figure 1B) (HAMIM *et al.*, 2017).

Les fleurs sont hermaphrodites, elles sont dispersées le long des branches (figure 1C). Elles s'épanouissent en très grand nombre du mois de mars au mois de mai et certaines variétés fleurissent même dès le mois de février. Ce sont de minuscules clochettes ovoïdes divisées jusqu'au milieu en lobes obtus, de couleur blanche et parfois rosée, de 4 mm de long. Les étamines ne dépassent pas la corolle mais lui font un cœur plus foncé tandis que les stigmates sont en bouliers et peu saillants. La pollinisation se fait de manière endogame et la dissémination est barochore (DERBEL, 2005 et RHATTAS, 2016).



**Figure 1:** Les différentes parties d'*Erica arborea* (A): buisson, (B): feuilles et (C): fleurs

(BOUCHER et DOUX, 2011).

D'après CHEVALIER (2008) et THIFFULT (2015), les tiges au dessus de la zone de l'insertion des racines, émettent des excroissances volumineuses appelées souches, de forme assez irrégulière et dont le niveau supérieur affleure le sol par production de rejets: le rhizome qui forme un gros bulbe de couleur rouge pesant plus d'un kilogramme.

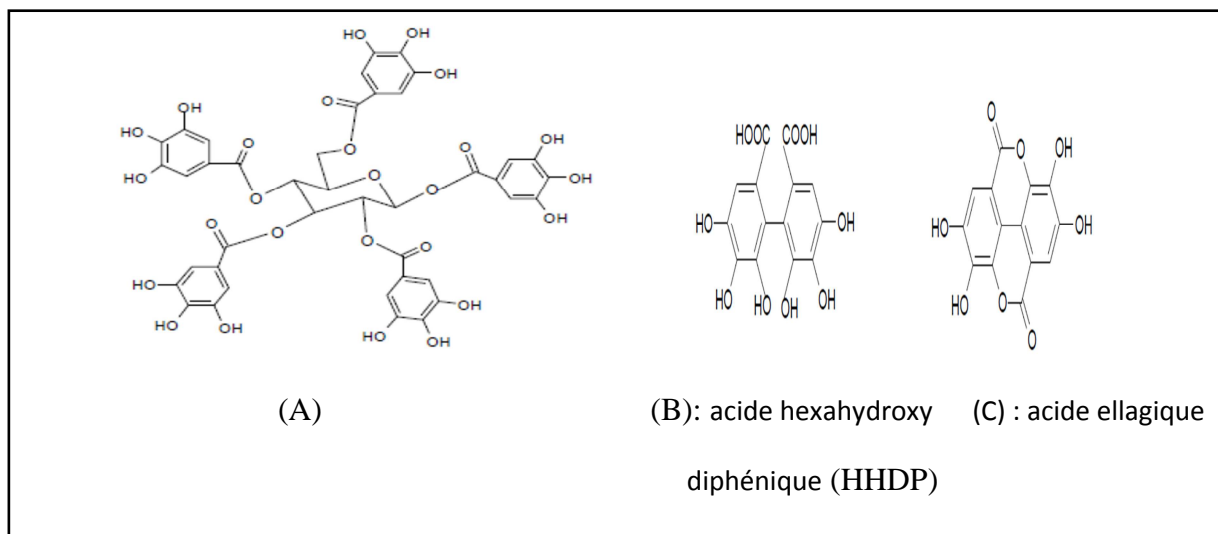
### 1.2. Etude phytochimique d'*Erica arborea*

Les métabolites secondaires regroupent de nombreuses substances présentes au niveau des plantes. Ces molécules, à structure chimique souvent complexe, pourraient intervenir dans des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes telles que la communication intercellulaire, la défense contre les herbivores, la régulation des cycles catalytiques et l'amélioration de la reproduction. Elles sont classés en trois grands groupes: les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (DERBEL, 2005).

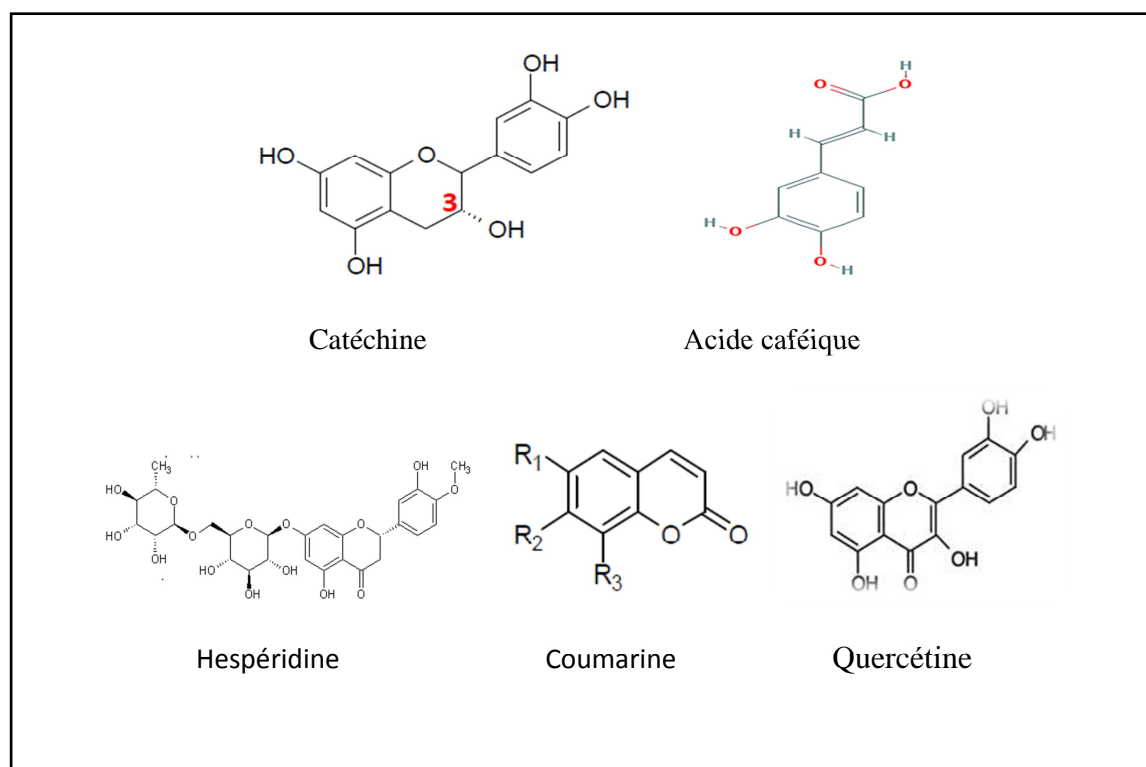
De nombreuses études phytochimiques d'*Erica arborea* ont montré sa richesse en métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les stérols, les glucosides et les mucilages. Différents composés phénoliques sont retrouvés au niveau des feuilles et des fleurs. Les tanins hydrolysables (galliques et ellagiques) et les saponines (35 types isolés) prédominent au niveau des feuilles, constituant plus de 50 % de l'ensemble des composés isolés (figure 2). Les métabolites les plus répandus au niveau des fleurs sont surtout les flavonoïdes notamment les flavanones (hespéridine), les flavan 3 ols (épicachétine), les flavonols (quercétine) et certains tanins condensés, mais aussi d'autres phénols tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, et les coumarines (figure3) (GUENDOUZE *et al.*, 2015 et DRISSI *et al.*, 2016). Par ailleurs, les terpènes sont le plus souvent isolés partir des fleurs (BAHADORI *et al.*, 2007 ; AMEZOUAR *et al.*, 2013 ;

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

GUENDOUZE *et al.*, 2015 et HAMIM *et al.*, 2017). Les différents métabolites secondaires identifiés chez *Erica arborea* sont illustrés dans le tableau II.



**Figure 2:** Structure chimique d'un tanin gallique (A) et structures de bases des tanins ellagiques (B et C) isolés des feuilles d'*Erica arborea* (BAHADORI *et al.*, 2007).



**Figure 3 :** Structures chimiques de quelques composés phénoliques isolés des fleurs d'*Erica arborea* (BAHADORI *et al.*, 2007 et HAMIM, 2017).

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

**Tableau II** : Différents métabolites secondaires isolés des parties aériennes d'*Erica arborea*.

<b>Familles</b>	<b>Groupes</b>	<b>Composés</b>	<b>Références</b>
	Monoterpènes	Carvacrol, B pénène et myrcène	(AMEZOUAR <i>et al.</i> , 2010).
	Triterpène	Acide ursolique	(AY <i>et al.</i> , 2007).
<b>Phénols</b>	Acides phénoliques	- acides gallique et ellagique: structure de bases des tanins hydrolysables. - acides férulique, chlorogénique et caféique.	(AY <i>et al.</i> , 2007 et GUENDOUZE <i>al.</i> , 2015).
	Flavonoïdes	- catéchine, épicatechine, quercétine et isoquercétine. - Proanthocyanidines.	(AMEZOUAR <i>et al.</i> 2013).
	Lignanes	Gimisine et lactol.	(BAHADORI <i>et al.</i> , 2007).
	coumarines	Simple: génine et divers hétérosides. pyranocoumarines: visnadine.	(BAHADORI <i>et al.</i> , 2007).
	Glycosides phénoliques	Ericoline et arbutine	(AY <i>et al.</i> 2007).
<b>Saponines</b>	Saponines triterpéniques	A:1-barrigénol (oléan-12-ène-3 $\beta$ , 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 22 $\alpha$ , 28-pentol)	(AY <i>et al.</i> , 2007).

D'après BESSAH et BENYOUSSEF (2014), l'analyse de l'huile essentielle extraite des parties aériennes d'*Erica arborea* montre plus de 75 composés chimiques dont les principaux sont: l'acide palmitique, le phytol, l'acide butanoïque et le [2- (1,1diméthyl-2-cyclopropyl)-1,1diméthyl- 3- cyclopropyl] (tableau III).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau III** : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d'*Erica arborea* (BESSAH et BENYOUSSEF, 2014).

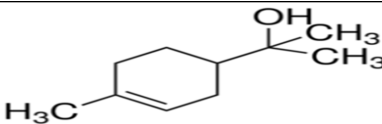
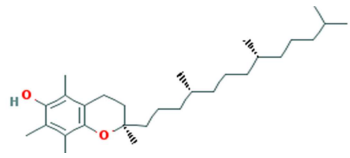
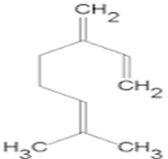
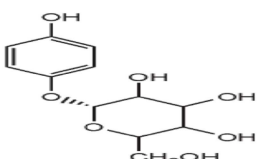
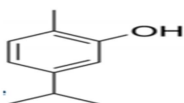
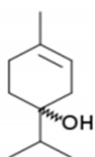
Composition chimique	%	Composition chimique	%
Acide palmitique	33	Dibutyl phthalate	0.9
9.12.15-Octadecatrien-1-ol, (Z.Z.Z)-	6.6	Caryophyllène	0.9
Nonacosane	6.1	Octacosane	0.8
Acide butanoïque	5.6	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.6
Phytol	3.3	Acide phtalique	0.6
[2- (1,1diméthyl-2-cyclopropyl)- 1,1diméthyl- 3- cyclopropyl]	2.3	Bicyclo [4.4.0] dec-1-ene, 2-isopropyl-5- methyl-9-methylene	0.4
Cis-3-hexène-1-ol	1.9	Acide pentadécylique	0.3
2- Ethyl-1- hexanol	1.9	Octacosane	0.2
Octan 1- ol	1.7	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	0.1
Pelargonaldehyde	1.1	Scalène	0.1

### 1.3. Activités biologiques d'*Erica arborea*

De nombreuses études ont montré que les feuilles et les fleurs de la bruyère arborescente présentent plusieurs activités biologiques à savoir une activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne. Les principales molécules responsables de ces activités ainsi que leurs structures chimiques sont illustrées dans le tableau IV.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau IV:** Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolés *d'Erica arborea* responsables de nombreuses activités biologiques.

Activités biologiques	Métabolites secondaires et leur Structures chimiques	Références.
<p style="text-align: center;"><b>Activité antioxydante</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p><math>\alpha</math>- Terpinéol</p>  <p><math>\alpha</math>-Tocopherol</p> </div>	<p style="text-align: center;">(BAHADORI <i>et al.</i> 2007 et AMEZOUAR <i>et al.</i> 2013).</p>
<p style="text-align: center;"><b>Activité anti-inflammatoire</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p>Myrcéne</p> </div>	<p style="text-align: center;">(NAYEBI <i>et al.</i>, 2008).</p>
<p style="text-align: center;"><b>Activité antibactérienne</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Arbutine</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Carvacrol</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Terpène 1- ol</p> </div>	<p style="text-align: center;">(AY <i>et al.</i>, 2007 et NÖTHLINGS <i>et al.</i>, 2007).</p>

### 1.3.1. Activité antioxydante

Le métabolisme cellulaire entraîne la formation d'espèces chimiques instables connues sous le nom de radicaux libres ou espèces réactives d'oxygène (ERO). Ces dernières en excès, peuvent être toxiques pour les tissus biologiques et source de lésions d'ADN, des

## ***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

---

lipides, des protéines et des membranes cellulaires. Cependant, l'effet antioxydant correspond à la capacité de certaines molécules bioactives à lutter contre les dommages oxydatifs provoquer par ces ERO et protéger ainsi les cellules et l'organisme (FAVIER, 2003).

Ainsi, *Erica arborea* présente un intérêt réel et potentiel par sa forte activité antioxydante et qui est expliquée par sa richesses en molécules connues par leur effet antioxydant notamment l'acide gallique, l'acide caféique, les flavonones, l'  $\alpha$  terpinéol et l'  $\alpha$  tocophérol. Ces principes actifs interviennent par piégeage direct des ERO et par chélation des ions de métaux de transition responsables de la production des ERO (BOUBAKER *et al.*, 2004; BAHADORI *et al.* 2007 et GUENDOUZE *et al.*, 2015).

### **1.3.2. Activité anti-inflammatoire**

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique et infectieuse. En effet, de nombreux composés phytochimiques sont dotés d'un effet anti-inflammatoire (NÖTHLINGS *et al.*, 2007). Ainsi, de nombreux essais ont révélé que les extraits éthanoliques d'*Erica arborea* en faibles doses réduisent significativement et rapidement l'œdème plantaire chez les rats (NAYEBI *et al.*, 2008). D'après AKKOL *et al.* (2008), les extraits floraux montrent une activité anti-inflammatoire plus significative que celle des feuilles. Cet effet anti-inflammatoire s'explique par la présence de nombreux phénols et flavonoïdes cités précédemment au niveau de tableau IV, entre autres: le Myrcène qui est un monoterpène qui inhibe l'activation du facteur de transcription des facteurs nucléaires impliqués dans la transcription de médiateurs pro-inflammatoires, la quercétine qui diminue la production des médiateurs inflammatoires (prostaglandines) en inhibant certaines enzymes comme la cyclooxygénase et l'acide gallique responsable de l'inhibition de la fixation du NF- $\kappa$ B, essentiel pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires (NAYEBI *et al.*, 2008 et AMEZOUAR *et al.*, 2013).

### **1.3.3. Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne d'une molécule correspond à sa capacité d'exercer un effet bactéricide ou bactériostatique vis-à-vis d'une bactérie. Les composés phénoliques isolés des plantes médicinales sont un moyen de défense contre de nombreux micro-organismes (NÖTHLINGS *et al.*, 2007).

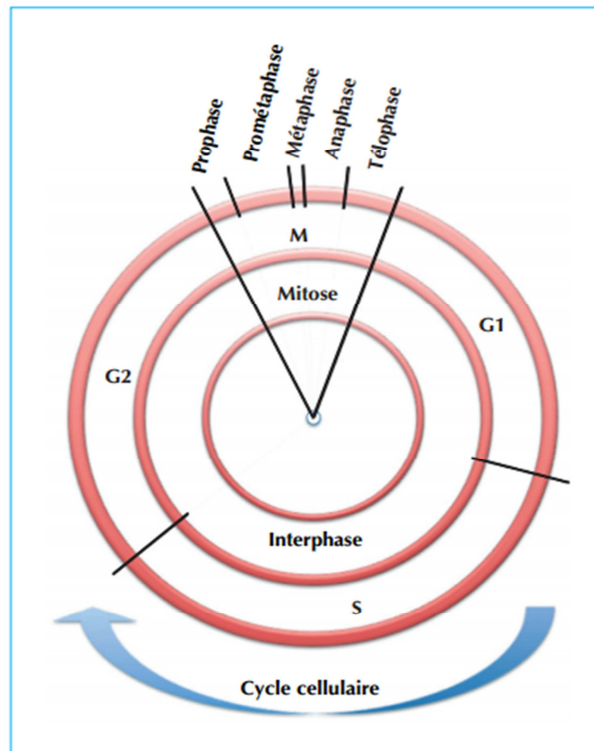
## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

En effet, Plusieurs études ont montré que les extraits d'*Erica arborea* peuvent inhiber la croissance de nombreuses espèces bactériennes notamment *Escherichia coli* et autres coliformes, le genre *Enterobacter*, *Helicobacter pylori* et *Staphylococcus aureus* (DUFFOUR *et al.*, 2007). Cette activité semble être liée à la formation du benzoquinone par hydrolyse bactérienne et oxydation spontanée de l'arbutoside contenu dans les sommités fleuries de cet arbuste (AY *et al.*, 2007 et DRISSI *et al.*, 2016). Le carvacrol (Tableau IV) isolé des feuilles d'*Erica arborea* modifie la perméabilité des membranes bactériennes et inhibe la production de toxines chez *Bacillus aureus* (BAHADORI *et al.*, 2007).

## II .La mitose

### Introduction

Le cycle cellulaire correspond à l'ensemble des étapes par lesquelles passe une cellule pour former deux cellules filles possédant le même patrimoine génétique. Ce dernier est composé de deux étapes principales: l'interphase I et la mitose M. L'interphase se divise en trois parties: la phase G1, la phase S et la phase G2, quant à la mitose, elle comprend quatre phases: la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (figure 4) (KARP, 2004).



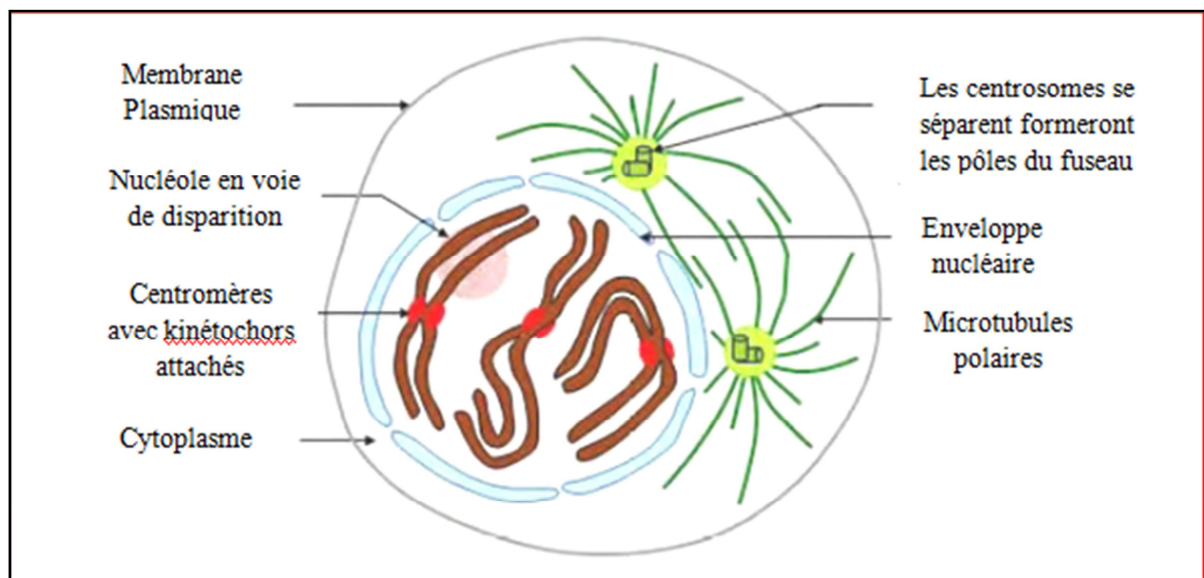
**Figure 4:** Les différentes phases du cycle cellulaire (DIALLO et PRIGENT, 2011).

### 2.1. Les différentes phases de la mitose

#### 2.1.1. La prophase

La prophase est caractérisée par une réorganisation de la chromatine qui se condense en chromosomes compacts facilement visibles en microscopie photonique (figure 5). Chaque chromosome est constitué de deux chromatides sœurs réunies au niveau du centromère, la cohésion entre les chromatides sœurs étant indispensable au partage équitable du génome qui aura lieu plus tardivement en anaphase (DOXSEY *et al.*, 2005).

Une autre caractéristique de la prophase correspond à la maturation des centrosomes. Riches en Tubuline  $\gamma$ , ils constituent des centres organisateurs de microtubules (MTOC), qui s'écartent et migrent progressivement de façon diamétralement opposée. Cette migration des centrosomes préfigure la localisation du fuseau mitotique. Les filaments d'actine se réorganisent et se répartissent de façon homogène au cortex cellulaire ce qui concourt à l'arrondissement qui caractérise les cellules à l'entrée en mitose (DOXSEY *et al.*, 2005).



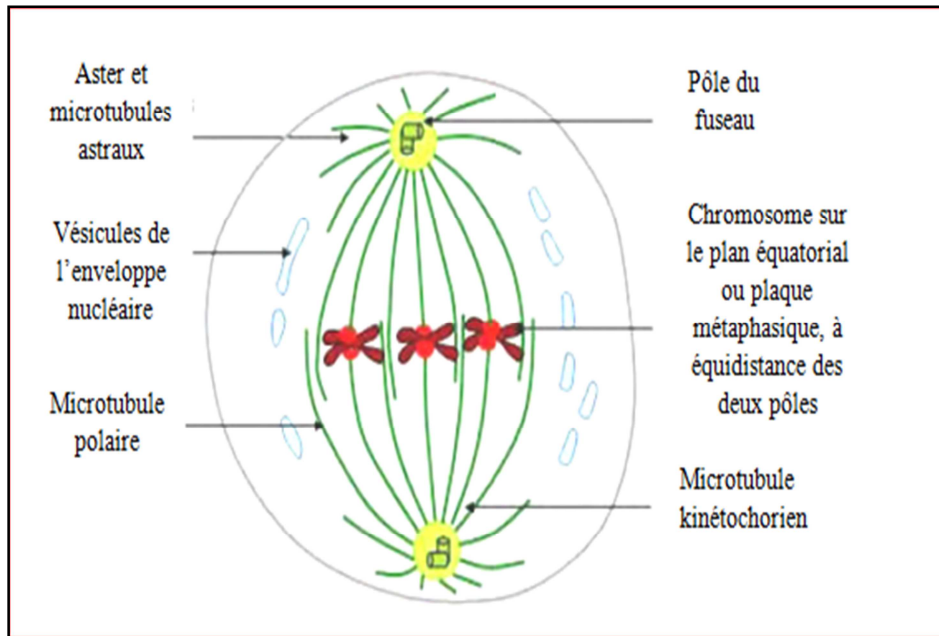
**Figure 5:** Représentation schématique d'une cellule en prophase (DOLISI, 2009).

#### 2.1.2. La métaphase

En métaphase, le fuseau mitotique est constitué de deux réseaux symétriques et antiparallèles de microtubules, qualifiés de kinétochoriens ou d'astraux (figure 6). De par l'équilibre des tensions exercées par les microtubules kinétochoriens provenant de chaque centrosome, les chromosomes vont s'aligner sur le plan équatorial pour constituer la plaque métaphasique (figure 6). Cette relocalisation des chromosomes s'effectue grâce au

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

remaniement dynamique des microtubules. La transition entre la métaphase et l'anaphase se fait suite à l'alignement du dernier chromosome sur la plaque métaphasique. La ségrégation des deux lots de chromosomes se produit lorsque la cohésion entre les chromatides sœurs est rompue, (DOXSEY *et al.*, 2005) .

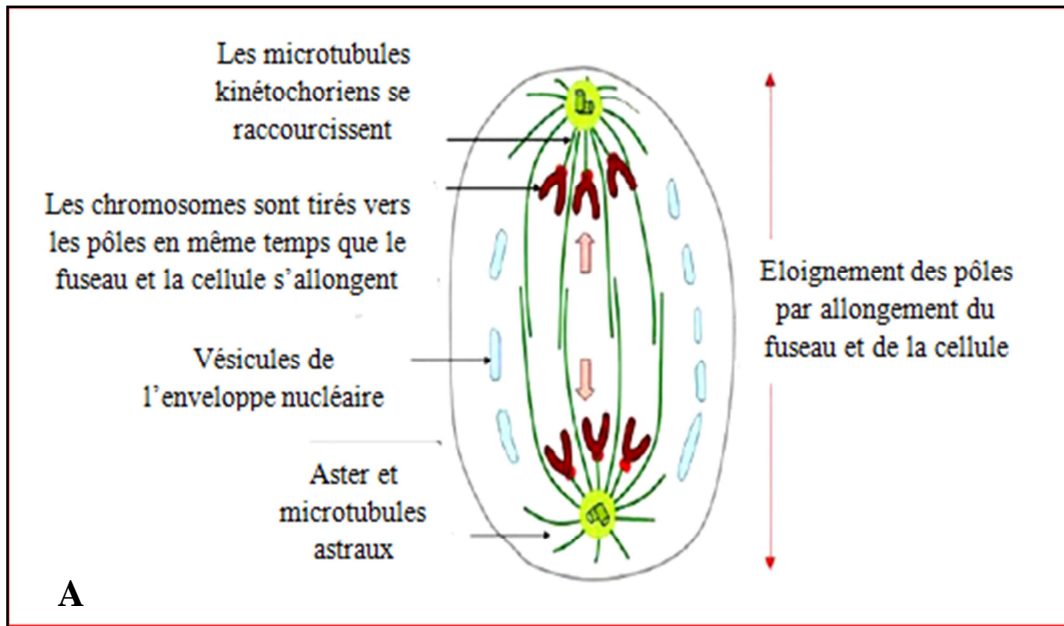


**Figure 6** : Représentation schématique d'une cellule en métaphase (DOLISI, 2009).

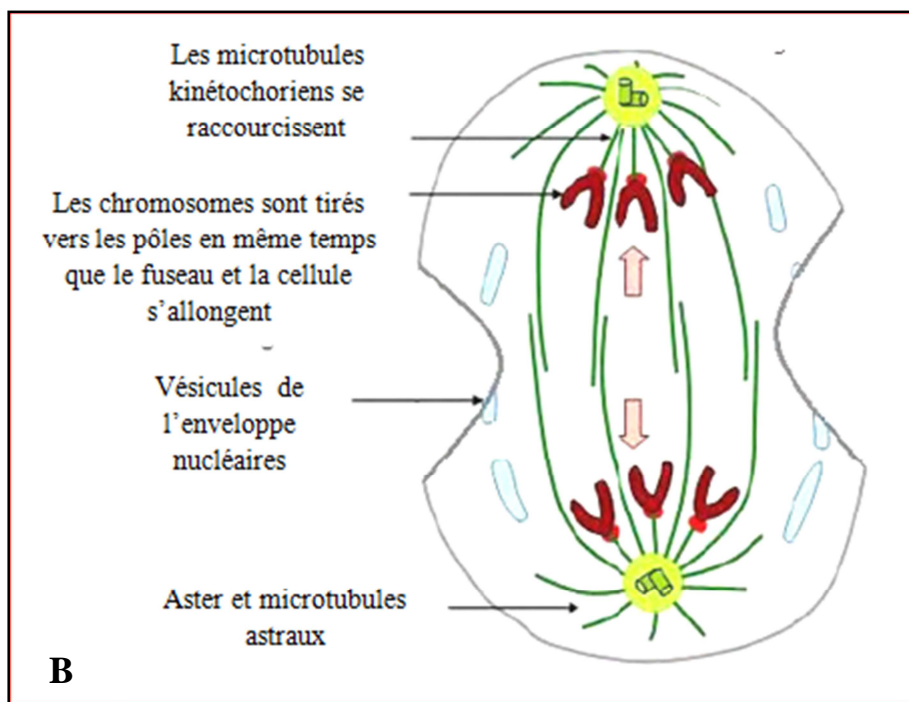
### 2.1.3. L'anaphase

L'anaphase peut être scindée en deux étapes, appelées anaphase A et anaphase B (figure 7). L'anaphase A est caractérisée par la ségrégation des deux chromatides sœurs de chaque chromosome. Elles vont migrer en sens inverse, en direction des pôles cellulaires grâce à un raccourcissement des microtubules kinétochoriens (ROBERT, 2010). Entre les deux lots de chromosomes, des microtubules polaires et des microtubules néoformés vont s'associer pour former le fuseau central, important pour localiser le sillon de clivage dans certains types cellulaires. L'anaphase B est caractérisée par un allongement du fuseau mitotique, induit par au moins deux types de forces. D'une part des forces répulsives au centre du fuseau qui tendent à éloigner les microtubules polaires provenant de chacun des deux pôles, et d'autre part des forces externes au fuseau exerçant une tension sur les microtubules astraux (DOXSEY *et al.*, 2005).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



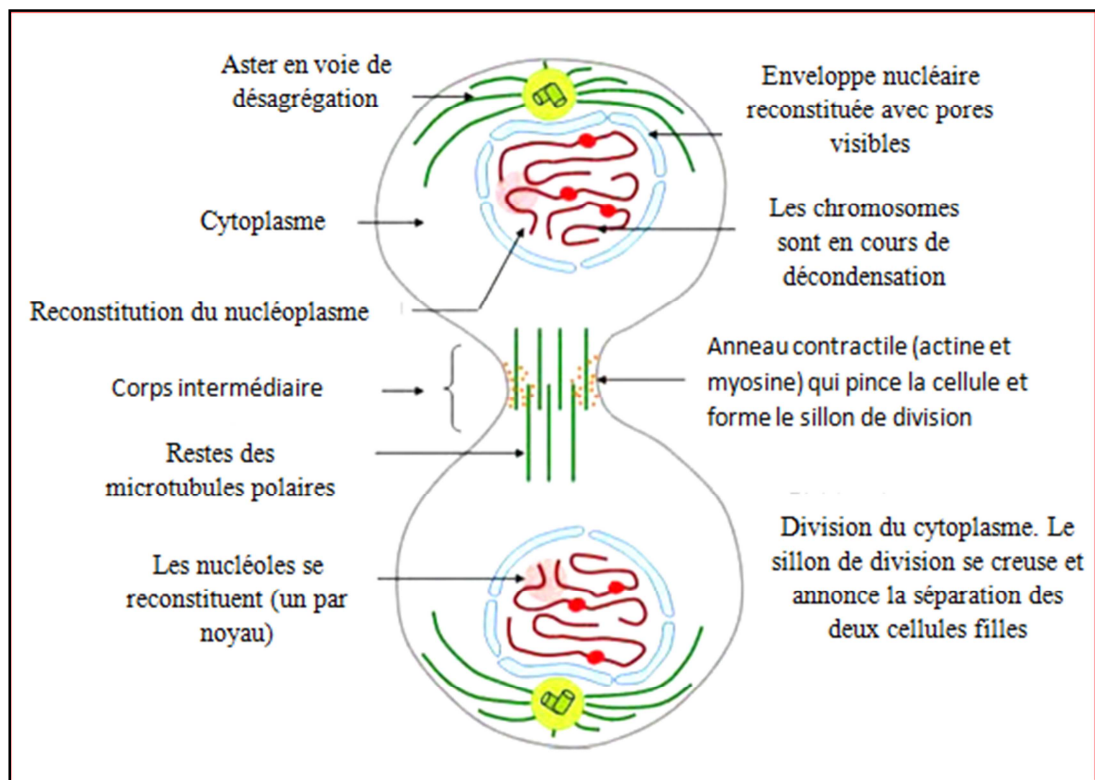
**Figure 7 (A):** Représentation schématique d'une cellule au début d'anaphase (DOLISI, 2009).



**Figure 7 (B):** Représentation schématique d'une cellule en fin d'anaphase (DOLISI, 2009).

### 2.1.4. La télophase

En télophase, les chromatides regroupées à chacun des deux pôles de la cellule se décondensent et les vésicules de l'enveloppe nucléaire se regroupent pour délimiter les deux nouveaux noyaux (figure 8). Les microtubules astraux se dépolymérisent, et les microtubules polaires du fuseau central se condensent pour former le corps intermédiaire à l'intérieur du pont intercellulaire qui relie les deux cellules filles (MULLINS et MSINTOSH, 1982 et ROBERT, 2010).



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

### III. Les agents antimitotiques d'origine végétale

Les antimitotiques d'origines végétales sont des molécules capables de perturber le cycle cellulaire d'une cellule. Ils agissent précisément au niveau de la tubuline durant l'étape de la mitose (MULLINS et MSINTOSH, 1982).

La tubuline est un hétérodimère composé de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Principale protéine structurale du fuseau mitotique, elle est capable de contrôler la dynamique des microtubules. A partir d'un centrosome, les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  s'associent puis se lient à des molécules de guanosine triphosphate (GTP).

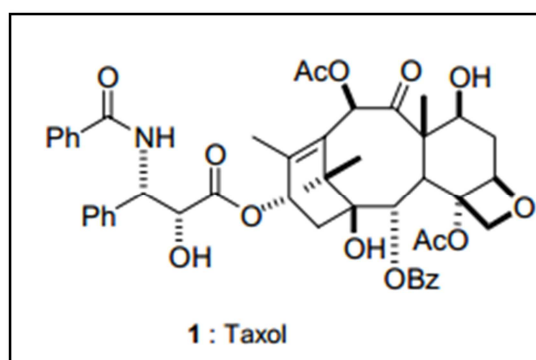
## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La concentration dans la cellule de tubuline-GTP augmente et les hétérodimères  $\alpha$  et  $\beta$  s'assemblent pour élaborer des protofilaments. Ces derniers s'ajoutent ensuite parallèlement entre eux jusqu'à former des tubes cylindriques. Ces microtubules orientent les chromosomes sur le plan équatorial et les guident vers chaque pôle de la cellule. Le fuseau mitotique se dépolymérise par son extrémité. Le GTP peut s'hydrolyser en GDP (guanosine diphosphate). Lorsque la concentration dans la cellule de « tubuline-GTP » diminue le microtubule devient instable, il se dépolymérise (BECKERS et MAHBOODI, 2003).

La formation du fuseau mitotique est un mécanisme ciblé par les agents antimitotiques. Ils sont classés en deux catégories: les antipolymérisants empêchent la polymérisation de la tubuline en microtubules, et les stabilisants inhibent la dépolymérisation de ces microtubules. Dans ces deux cas, la mitose ne peut se dérouler normalement, ce qui bloque ainsi la prolifération cellulaire (NOGALES *et al.*, 1999). On compte trois grands groupes de ces agents antimitotiques: les taxoïdes, les vinca-alcaloïdes et les alcaloïdes (BECKERS et MAHBOODI, 2003).

### 3.1. Les taxoïdes

Les taxoïdes sont des composés qui stabilisent les microtubules et empêchent ainsi leur dépolymérisation, ce qui a pour effet de stopper le processus de division cellulaire entre la métaphase et l'anaphase. Cette action ne conduit pas obligatoirement à la mort de la cellule. Ces composés se lient sur la sous-unité  $\beta$  à l'intérieur du tube que forment les microtubules. Parmi ces molécules on cite l'exemple du taxol (DABYDEEN *et al.*, 2004). Le Paclitaxel (Taxol) est un diterpénoïde (figure 9), une molécule naturelle découverte en 1971. Elle est extraite de l'écorce de *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971). Elle favorise la transition dépolymérisation / polymérisation en se fixant sur la tubuline  $\beta$  et stoppe la progression des cellules en prométaphase avec un fuseau mitotique anormal, l'organisation dynamique de la cellule lors de la mitose est interrompue (SNYDER *et al.*, 2001).

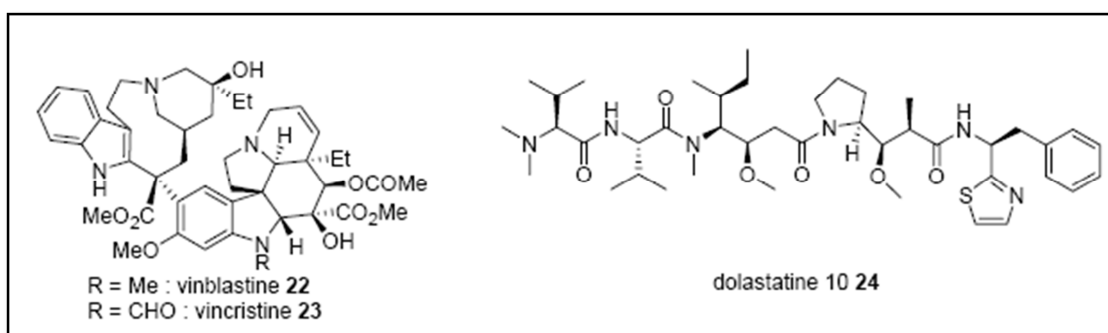


**Figure 9:** Structure chimique du Taxol et ses dérivés (SNYDER *et al.*, 2001).

## 3.2. Les vinca-alcaloïdes

Les vinca-alcaloïdes sont issus de la pervenche de Madagascar: *Catharanthus roseus*. Ces derniers inhibent la polymérisation de la tubuline et provoquent ainsi un blocage du cycle cellulaire lors de la mitose, aboutissant à la mort cellulaire. Parmi ces molécules, on cite l'exemple de la vinblastine et de la vincristine (SAVRY, 2012).

La vinblastine et la vincristine sont deux alcaloïdes bisindoliques isolés à partir de *Catharanthus roseus* (Figure 10). Ce sont deux composés antimitotiques qui ont pour action d'inhiber la polymérisation de la tubuline en se liant sur la sous-unité  $\beta$ . Afin d'augmenter leur activité de nombreux analogues ont été synthétisés. D'autres produits naturels se fixent également au même site sur la tubuline, comme la dolastatine qui a été isolée à partir d'un mollusque marin (GIGANT *et al.*, 2005).



**Figure 10:** Composés se fixant au site des vinca-alcaloïdes (GIGANT *et al.*, 2005).

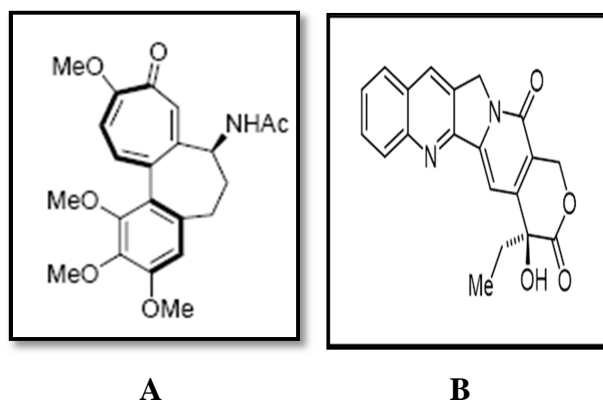
## 3.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe de molécules bioactives hétérogènes (GUIGNARD *et al.*, 1985). Ils exercent une action intense mais dotée en contre partie d'une toxicité très élevée, ce qui limite leur utilisation thérapeutique. Parmi ce molécules on cite l'exemple de colchicine A et de la La Camptothécine (PARIS et HURABIELLE, 1981 et BHALKAR *et al.*, 2016).

La colchicine A est le premier composé antimitotique naturel à avoir été découvert (Figure 11). Cette molécule est extraite d'une plante *Colchicum autumnale*. A cause de sa toxicité trop élevée, elle ne peut être utilisée comme agent anticancéreux. Le site d'action de la colchicine sur la tubuline se trouve au niveau de la sous-unité  $\beta$  à l'interface avec la sous-unité  $\alpha$ . La colchicine forme un complexe avec les dimères de tubuline à l'intérieur de la matrice des microtubules, ce qui a pour effet de bloquer la polymérisation de la tubuline en microtubules (BOYE *et al.*, 1993).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La Camptothécine est un alcaloïde pentacyclique isolé de *Camptotheca acuminata* (arbre très répandu en Chine). Cette molécule a une action sur la Topoisomérase de type I en formant un complexe stable avec l'enzyme liée au brin d'ADN, il en résulte un blocage physique de la molécule d'ADN. La Camptothécine est un Prototype des inhibiteurs de la Topoisomérase, elle constitue une matière première pour l'obtention de dérivés hémisynthétiques utilisés en thérapie anticancéreuse, c'est le cas de l'Irinotécan et du Topotécane (BHALKAR *et al.*, 2016).



**Figure 11:** Structures chimiques de la colchicine A (A) et de la Camptothécine (B)

(BHALKAR *et al.*, 2016).

### IV. Les molécules cytotoxiques d'origine végétale

Les plantes médicinales constituent une source importante de molécules bioactives, largement exploités dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Parmi ces métabolites secondaires, on distingue les flavonoïdes et les alcaloïdes. Ce sont des molécules essentiellement connus pour leurs nombreuses activités biologiques à savoir, antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses (ARRAKI, 2014).

#### 4.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes rassemblent une très large gamme de composés polyphénoliques. Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides (GHERDIRA, 2006). Plusieurs études *in vitro* ont montré l'effet antiprolifératif et cytotoxique de ces flavonoïdes vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires (BOSETTI *et al.*, 2005 et FINK *et al.*, 2007). Les flavonoïdes sont connus pour leurs effets inhibiteurs de la prolifération cellulaire.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La progression des cellules eucaryotes au travers des différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par une famille de serine/thréonine kinases, les CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) associées à leurs partenaires cyclines. La formation et l'activation des complexes CDK-cyclines s'effectuent selon un ordre précis permettant le bon déroulement du cycle. Toute perturbation dans l'expression ou l'activité des protéines participant à ce réseau intègre, peut conduire à une dérégulation de la prolifération et à la transformation cellulaire (FINK *et al.*, 2007).

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

### 4.2. Les alcaloïdes

Des études ont montré que certains alcaloïdes sont dotés d'un pouvoir cytotoxique très important, nous citons à titre d'exemple l'Homoharringtonine (HHT) qui est un alcaloïde végétal naturel dérivé de *Cephalotoxus fortunei*. Cette molécule a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique. Le HHT se lie au ribosome 80S dans les cellules eucaryotes et inhibe la synthèse des protéines en interférant avec l'élongation de la chaîne (BHALKAR *et al.*, 2016).

# **Partie expérimentale**

## **I. Matériel et méthodes**

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, son objectif consiste en la détermination des effets antimittotique et antiprolifératif *in vitro* des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.

### **1.1. Matériel**

#### **1.1.1. Matériel biologique**

Les parties aériennes de la plante *Erica arborea*, préalablement identifiée, ont été collectées dans la région de Tamentout dans la commune de Djimla au sud-est de la wilaya de Jijel entre avril et fin mai durant la saison printanière 2016. Des racines jeunes d'*Allium cepa* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont servi comme modèles expérimentales à l'étude respective des activités antimittotique et antiproliférative.

#### **1.1.2. Matériel de laboratoire**

En plus du matériel usuel de laboratoire présenté en annexe 1, nous avons utilisé aussi la cellule de Malassez, le spectrophotomètre et une plaque de 12 puits d'un volume de 5 ml chacun.

#### **1.1.3. Solvants et réactifs**

Les solvants et les réactifs utilisés dans cette étude ainsi que leurs concentrations sont illustrés dans le tableau V.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

**Tableau V:** Solvants et réactifs utilisés.

<b>Solvants et réactifs</b>	<b>Concentrations</b>	<b>Rôles</b>	<b>Activité</b>
<b>Colchicine</b>	1mg/ml	Agent antimitotique	Antimitotique
<b>Solution de fixation</b>	Acide acétique / éthanol: (1/3)	Bloque la mitose et conserve l'intégrité chromosomique	
<b>Carmin acétique</b>		Offre un bon contraste entre les chromosomes colorés en rouge et le cytoplasme incolore	
<b>Quercétine</b>	1mg/ml	Agent cytotoxique et antiprolifératif	Antiproliférative
<b>MTT</b>	10 %	Entraine la formation de cristaux de formazan.	
<b>SDS</b>	20%	Solubilisation des cristaux de formazan	

### **1.1.4. Milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae***

Le milieu de culture utilisé contient essentiellement une source de carbone (glucose), une source d'azote (bactopeptone) et de l'acide citrique offrant ainsi tout les nutriments indispensables à la prolifération de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Son acidité (pH= 3.8) lui confère une bonne sélectivité. La composition de ce milieu de culture et sa préparation sont présentées en annexe 2.

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Préparation des extraits aqueux**

Les feuilles et les fleurs de l'arbuste *Erica arborea* ont été séparément nettoyées de toutes trace de terre et séchées à l'ombre à température ambiante. Ensuite, elles ont été broyées pour obtenir une poudre fine, utilisée pour la préparation des extraits aqueux.

Le protocole utilisé pour la préparation de nos extraits aqueux est celui adopté par MIOARA *et al.* (2005) ; SOUNOUGOU (2012) et YUET PING *et al.* (2012). 5 mg du broyat de feuilles sont macérés dans 50 ml d'eau distillée pendant 24 heures à température ambiante.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

L'extrait a été ensuite séparé du résidu par filtration à travers du papier wattman N° 1. Ainsi, On obtient une suspension mère de feuilles d'*Erica arborea* (annexe 3). Cette suspension a servi à la réalisation de 3 dilutions: 1/2, 1/4 et 1/8. De même pour la préparation de l'extrait aqueux des fleurs. Les différentes dilutions de nos extraits aqueux ont été utilisées ultérieurement pour l'évaluation *in vitro* des activités antimittotique et antiproliférative.

### **1.2.2. Evaluation *in vitro* de l'activité antimittotique des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.**

Au cours de cette étude nous avons déterminé l'effet antimittotique de nos extraits en se basant sur le test d'*Allium cepa*. Mis au point par DEYSSON (1948), ce test représente un modèle de référence pour l'évaluation de l'activité antimittotique *in vitro*. il est validé par le Programme de l'Environnement des Nations Unies (UNEP) et par le Programme International de la Sécurité Chimique (IPCS) (MEDJEBER *et al.*, 2018).

Des bulbes d'oignons (*Allium cepa*) ont été mis à germer dans de l'eau pendant 3 à 4 jours afin d'obtenir des racines contenant des cellules méristématiques en division (figure12). La croissance des racines est rapide, de l'ordre de quelques mm par jour. Elle résulte des mitoses qui se produisent dans le méristème racinaire située dans la zone subapicale de la racine.



**Figure 12:** Culture des bulbes et obtention des racines d'*Allium cepa*.

Les racines sélectionnées sont mises en contact pendant 24 heures avec les différentes dilutions des extraits aqueux ainsi que la colchicine utilisée comme témoin positif.

Par la suite, ces racines sont fixées par une solution de fixation (acide acétique/ alcool: V/V: 1/3) 1 à 2 heures. A ce niveau les échantillons subissent une étape de coloration

## PARTIE EXPERIMENTALE

en utilisant le carmin acétique (figure 13). Ce dernier colore en particulier les chromosomes tandis que le cytoplasme des cellules reste incolore (DEYSSON, 1970).

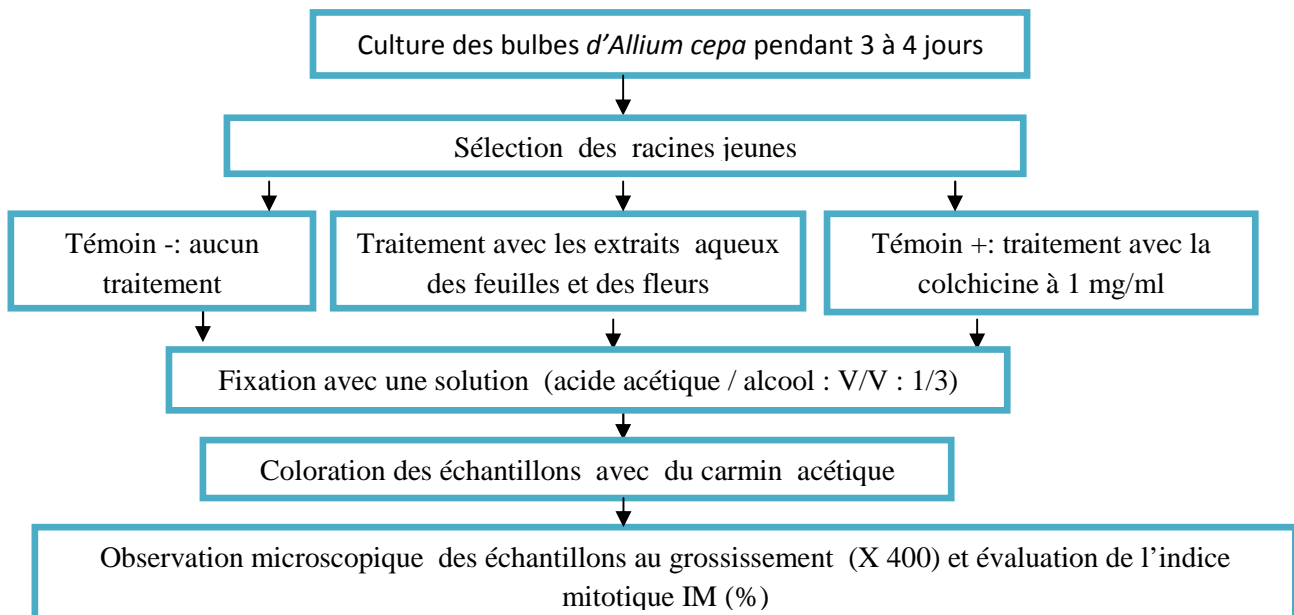


**Figure 13:** Préparation des lames microscopiques pour le test *Allium cepa*.

L'observation au microscope optique au grossissement (X400) permet la détermination de l'indice mitotique (IM %) qui est défini par le ratio de cellules en division sur le total des cellules comptées (350 cellules) (SHIVASHARANAPPA et LONDONKAR, 2014). Les IM sont obtenus selon l'équation suivante:

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

Les différentes étapes du protocole expérimental adapté pour l'étude de l'activité antimitotique sont illustrées dans l'organigramme suivant:



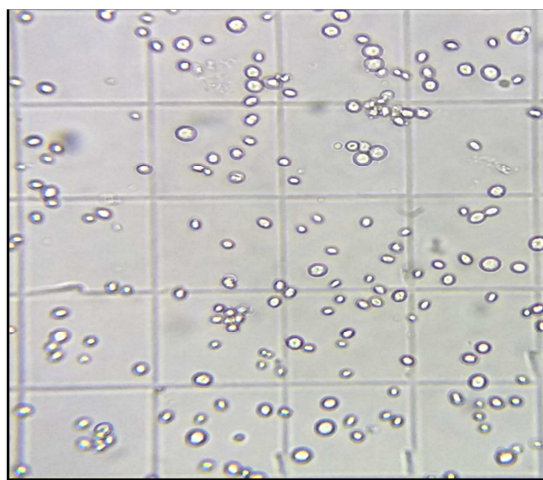
**Figure 14:** Schéma du protocole expérimental de l'activité antimitotique.

### **1.2.3. Mise en évidence de l'effet antiprolifératif des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea***

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie comme modèle de cellule eucaryote pour la mise en évidence de l'effet antiprolifératif de nos extraits. Ce choix est justifié par le fait que les mécanismes moléculaires impliqués dans la division cellulaire sont conservés chez les eucaryotes. Cette espèce, selon DEJOS (2014), est un modèle pertinent pour l'étude préliminaire des effets antiprolifératifs et cytotoxiques des molécules anticancéreuses et de leurs modes d'actions.

#### **1.2.3.1. Préparation de la suspension de *Saccharomyces cerevisiae***

Le milieu de culture est aseptiquement coulé dans des boîtes de pétri à environ 2 à 3 mm d'épaisseur. Ces boîtes sontensemencées par 2 à 3 g de levures de commerce lyophilisée et sont bien agitées par des mouvements circulaires avant d'être incubées à 37 C ° pendant 24 heures afin de réactiver les cellules. Ces cultures ont servi pour la préparation des suspensions de levures standardisées avec une DO de 1.6 à 1.8 à une longueur d'onde de 650 nm et correspondant à une densité de  $10^6$  à  $10^8$  cellules par ml. Il est à noter que la concentration cellulaire de cette suspension a été aussi déterminée par un comptage direct en utilisant la cellule de Malassez (figure15).

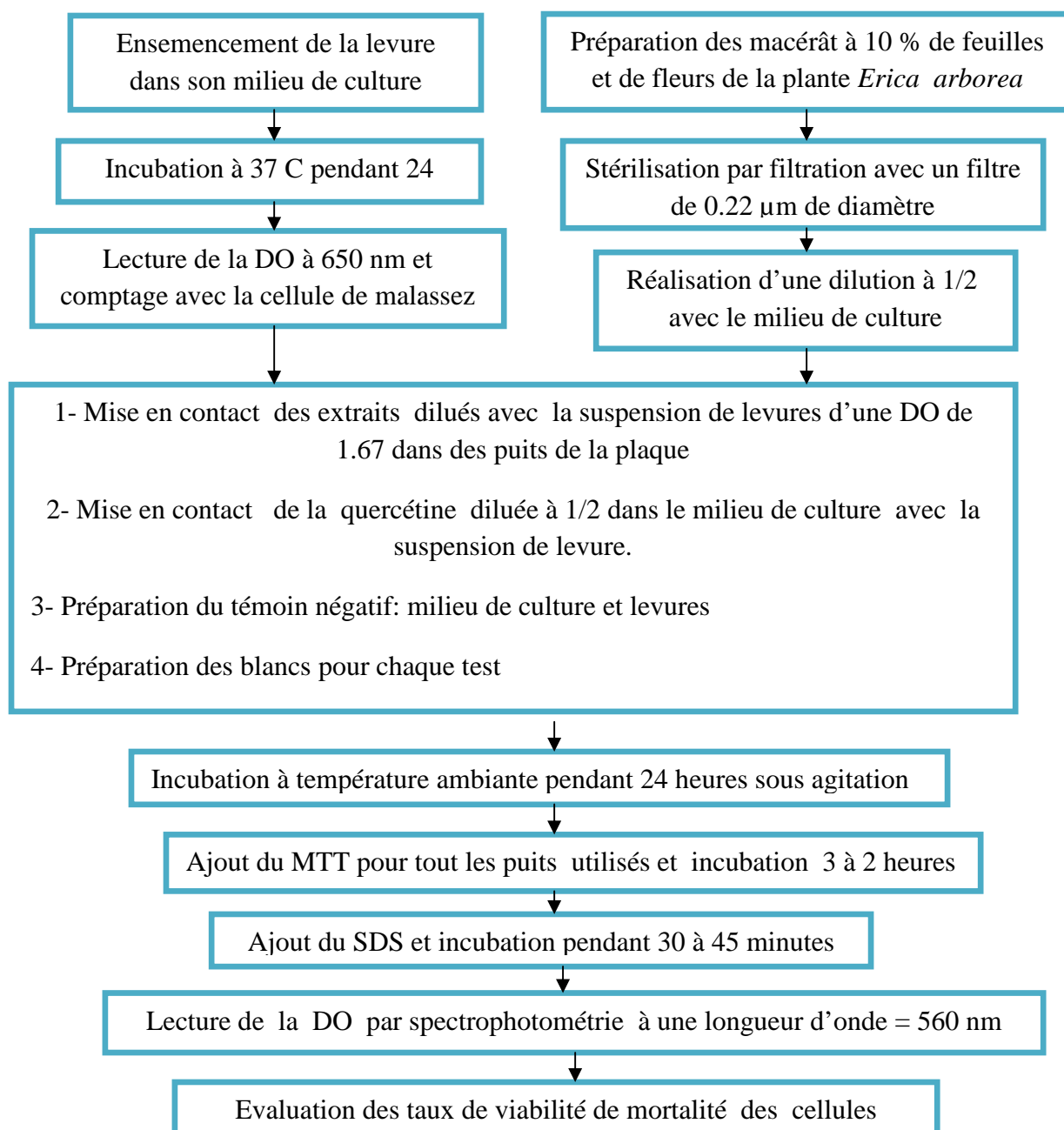


**Figure 15:** Cellule de Malassez utilisée pour comptage des levures vue sous microscope optique.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### 1.2.3.2. Test antiprolifératif-MTT

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antiproliférative de nos extraits sur le taux de croissance global d'une suspension de levure par le test antiprolifératif-MTT (mitochondrial tetrazolium test) en utilisant une plaque. Le protocole expérimental global pour l'étude de cette activité est illustré au niveau de la figure 16.



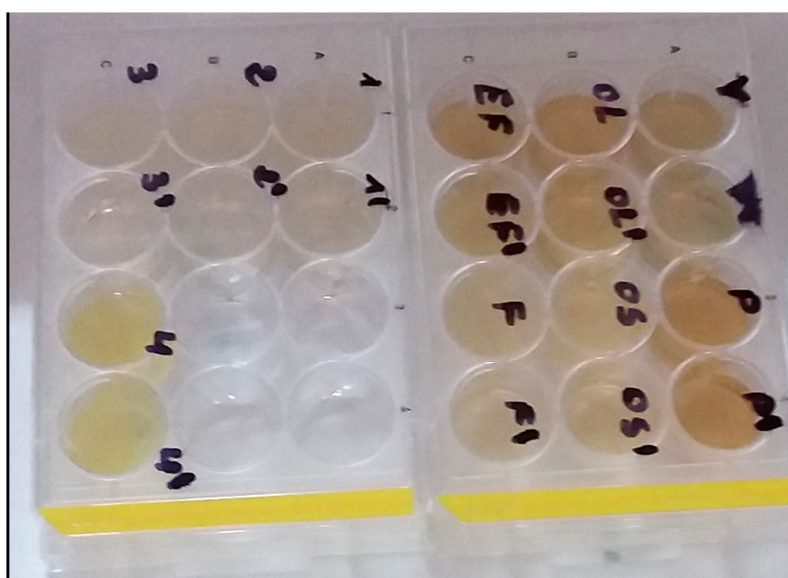
**Figure 16:** Schéma du protocole expérimental du test MTT utilisant *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle dans l'étude de l'activité antiproliférative des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

Initialement décrit par MOSMANN en 1983 puis modifié par CARMICHAEL en 1987, le test MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des cellules vivantes métaboliquement actives à réduire le sel de tetrazolium (de couleur jaune) par leur succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan (de couleur violette). Le nombre de cellules vivante après 24 heures d'incubation avec ou sans les extraits à tester est directement proportionnelle à l'intensité de la réduction du MTT mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 560 nm. Les échantillons sont ensuite incubés en présence du SDS pendant 30 à 45 minutes avant la lecture au spectrophotomètre. L'usage de ce détergent permet la solubilisation des cristaux de formazan assurant ainsi une meilleure fiabilité des densités optiques mesurées.

### **1.2.3.3. Préparation de la plaque**

Nous avons utilisé une plaque à 12 puits et à fond rond ayant un volume de 5ml chacun. Chaque puit utilisé reçoit au total un volume de 2.7 ml (figure 17).



**Figure 17:** Répartition des différents extraits au niveau de la plaque lors du test antiprolifératif-MTT.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

Ainsi :

- les 2 puits servant à l'étude de l'effet des extraits reçoivent chacun 800  $\mu$ l de la suspension de levure à une DO de 1.67 et 1 ml de l'extrait aqueux filtré dilué à 1/2 des feuilles ou des fleurs de la plante *Erica arborea* tandis que les puits qui leur servent de blancs ne reçoivent pas la suspension de levures.

- un cinquième puit servant à l'étude de l'action du standard (quercétine) reçoit 1 ml d'une solution à 2% diluée à 1/2 dans le milieu de culture de celle-ci et 800  $\mu$ l de la suspension de levures alors que son blanc reçoit 1 ml de cette solution et 800  $\mu$ l de milieu de culture.

- un septième puit servant de témoin négatif est inoculé par 1 ml de milieu de culture et 800  $\mu$ l de la suspension de levures, son blanc contient juste 1.8 ml de milieu de culture.

- Cette plaque est incubée pendant 24 heures à température ambiante et sous agitation.

- Un volume de 200  $\mu$ l de sel de tetrazolium à une concentration de 10 mg / ml est introduit dans la totalité des puits utilisés. La plaque est incubée à 37 C° pendant 3 à 4 heures. A ce stade, 700  $\mu$ l de la solution de SDS à 20 % sont introduites dans ces puits afin de dissoudre les cristaux de formazan, la plaque est agitée pendant 30 à 45 minutes. Le tableau VI montre la composition des puits utilisés.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

**Tableau VI:** Composition du mélange réactionnel du test MTT.

<b>Substance (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Témoin négatif / blanc</b>		<b>Témoin positif / blanc</b>		<b>Extrait / blanc</b>	
	Témoin négatif	blanc	Témoin positif	blanc	Extrait	Blanc
<b>Extrait</b>	-	-	-	-	1000	1000
<b>Milieu de culture</b>	1000	1800	-	1000	-	800
<b>Suspension de levure</b>	800	-	800	800	800	-
<b>quercétine</b>	-	-	1000	-	-	-
<b>MTT</b>	200	200	200	200	200	200
<b>SDS</b>	700	700	700	700	700	700
<b>TOTAL (<math>\mu</math>l)</b>	2700	2700	2700	2700	2700	2700

### **1.2.3.4. Lecture des densités optiques au spectrophotomètre**

Le taux de viabilité cellulaire dans chaque puit est évalué par détermination de la DO à l'aide d'un spectrophotomètre à 560 nm et à partir duquel le taux d'inhibition est ensuite calculé.

### **1.2.4. Analyse statistique**

Pour l'activité antimittotique, les déterminations ont été effectuées en 5 essais et exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard (ES). Les différents résultats ont été comparés par un test de Student et une analyse de la variance (ANOVA), ces tests sont effectués avec le logiciel Statistica 7.1. Les valeurs de P inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

## II. Résultats et discussion

### 2.1. Activité antimittotique des extraits aqueux de feuilles et de fleurs d'*Erica arborea*

L'activité antimittotique des extraits aqueux de feuilles et de fleurs d'*Erica arborea* est évaluée par la détermination de l'indice mitotique (IM), qui représente le rapport des cellules en division sur l'ensemble des cellules considérées. Notre étude a montré que l'indice mitotique des cellules méristématiques d'*Allium cepa* en contact d'eau distillée (témoin négatif) est de  $82.72 \pm 0.92$  (%). L'indice mitotique des cellules traitées avec la colchicine à 1mg / ml (témoin positif) est de  $37.31 \pm 0.76$ . Pour ce qui est des indices mitotiques obtenus en présence des extraits floraux, les valeurs sont de  $45,496 \pm 0,84$ ,  $38,828 \pm 2,84$  et  $47,426 \pm 1,36$  respectivement pour les dilutions 1/2, 1/4 et 1/8. Cependant, les cellules méristématiques traitées avec les 3 dilutions de l'extrait aqueux de feuilles présentent des indices mitotiques intermédiaires compris entre  $51,882 \pm 1.26$  % et  $56.55 \pm 2.02$  %, tel que le montre le tableau VII et la figure 16.

**Tableau VII:** Indices mitotiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.

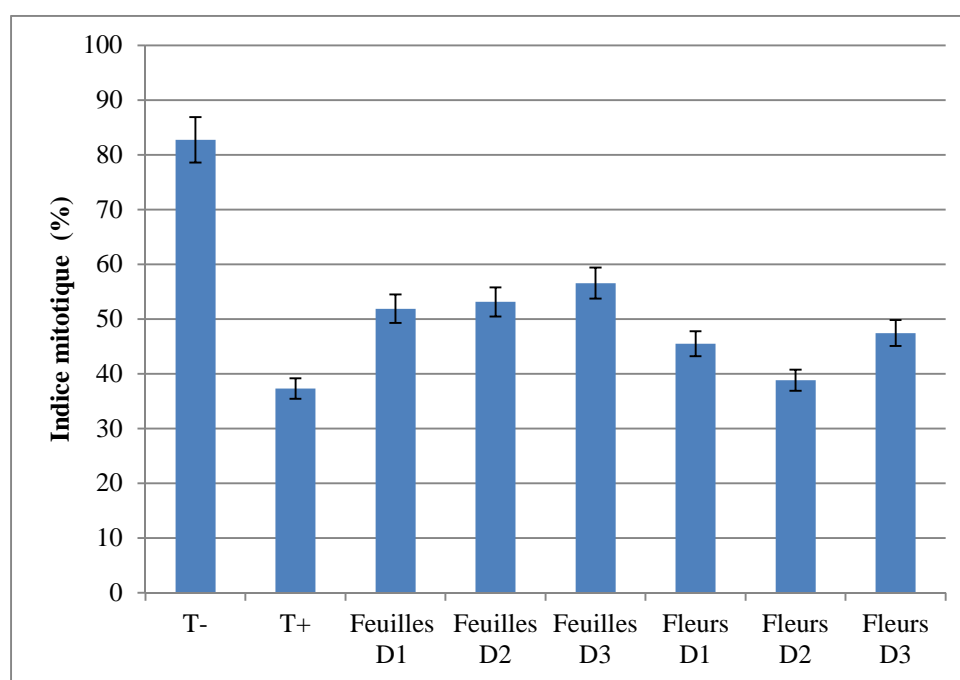
Indices mitotiques (%)			
Témoins	Eau distillé (T-)	$82,72 \pm 0,92$	
	Colchicine (T+)	$37,31 \pm 0,76$	
Plantes	<i>Erica arborea</i> (Fleurs)	Dilution 1/2	$45,496 \pm 0,84$
		Dilution 1/4	$38,828 \pm 2,84$
		Dilution 1/8	$47,426 \pm 1,36$
	<i>Erica arborea</i> (Feuilles)	Dilution 1/2	$51,882 \pm 1,26$
		Dilution 1/4	$53,134 \pm 0,97$
		Dilution 1/8	$56,55 \pm 2,02$

Il ressort des différentes études que les indices mitotiques obtenus sur des cellules méristématiques en utilisant des extraits de feuilles sont d'une certaine variabilité. Les IM que nous avons calculés sont similaires à ceux obtenus par FASLA (2009) et ELYOUBI *et al.* (2012) en utilisant des extraits aqueux des feuilles de *Ruta chalepensis* (Rutaceae) et de *Calluna vulgaris* (Ericaceae). AIT SAID *et al.* (2015) et MBAYO *et al.* (2016) ont obtenu des IM supérieurs (entre 50 et 65 %) en utilisant des extraits aqueux des feuilles d'*Erica*

## PARTIE EXPERIMENTALE

*multiflora* et de 16 plantes appartenant à la famille des Euphorbiaceae. Cependant, des IM nettement inférieurs (entre 25 et 35%) ont été obtenus avec des extraits aqueux des feuilles d'*Euphorbia hirta* (Lauraceae) et *tetraclinis articulata* (Cupressaceae) (FASLA, 2009 et YUET PING, 2012).

Il en ressort également que la dilution 1/4 de l'extrait aqueux des fleurs d'*Erica arborea* à un effet antimitotique très proche de celui de la colchicine. Des indices mitotiques similaires (36 à 38 %) ont été obtenus par AIT SAID *et al.*, 2015 en utilisant l'extrait floral d'*Erica multiflora* et par LOBSTEIN *et al.*, 2017 sur des cellules méristématiques traitées avec des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (Lauraceae). De même que les IM que nous avons obtenu sont largement inférieurs à ceux obtenus en utilisant des extraits aqueux des fleurs de nombreuses espèces appartenant aux familles des Ericaceae, Lauraceae, Cupressaceae, Asteraceae, Caricaceae et Vitaceae (AKINBORO et BAKARE, 2007; FASLA, 2009; SHIVASHARANAPPA et LONDONKAR, 2014 et ABUDUNIA *et al.*, 2017). Cependant, MARTINET *et al.* (2005) ont obtenu des IM plus faible (qui varient entre  $21.26 \pm 2.6 \%$  et  $34.23 \pm 1.6\%$ ) sur des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec des extraits floraux d'*Agauria salicifolia* appartenant à la même famille qu'*Erica arborea* (Ericaceae).



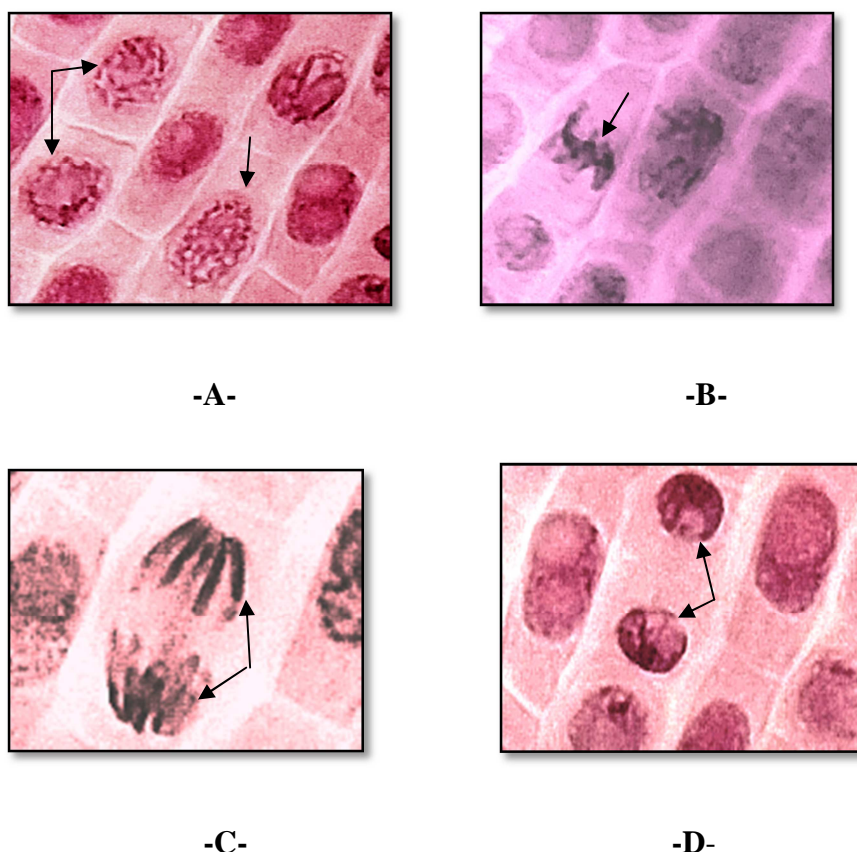
**Figure 18:** Indices mitotiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.

## PARTIE EXPERIMENTALE

L'indice mitotique est considéré comme un paramètre permettant d'estimer la fréquence de la division cellulaire. Il permet d'évaluer les effets antimitotiques et génotoxiques des divers extraits naturels (MARCANO *et al.* 2006).

Ainsi, lorsque cet indice diminue en dessous de 22 % du témoin négatif il provoque un effet létal sur les organismes test. Une diminution de 50 % de cet IM par rapport au témoin négatif est considérée comme sublétale et est nommée valeur limite de cytotoxicité (FALSA, 2009). Selon ces deux définitions on pourra déduire que la dilution 1/4 de l'extrait floral d'*Erica arborea* est considérée comme sublétale pour les cellules d'*Allium cepa*.

Les cellules méristématiques se divisent naturellement et rapidement ce qui justifie les IM mitotique élevés obtenus pour les échantillons témoins négatifs. Tout les stades de la mitose ont été nettement observés sans anomalies de division remarquables à savoir: la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase comme le montre la figure (figure 19).

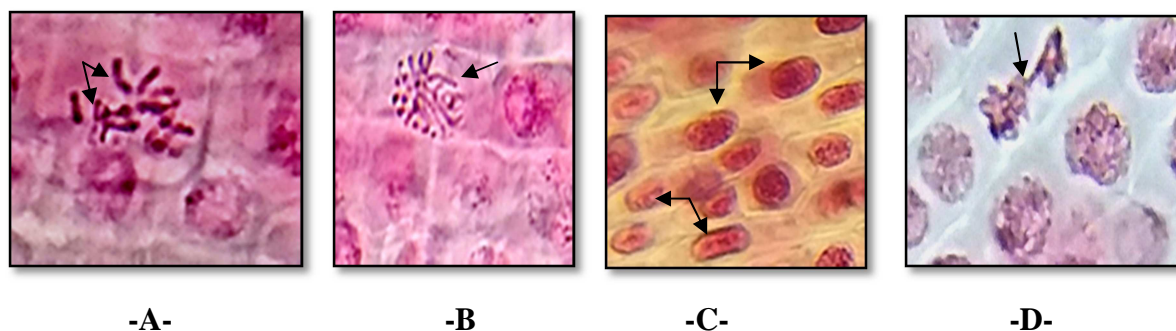


**Figure19:** Les différentes phases de la mitose rencontrées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* (témoin négatif) (X 400).

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

## PARTIE EXPERIMENTALE

Le faible IM mitotique, qui est de  $37,31 \pm 0,76$ , des cellules méristématiques traitées avec la colchicine (témoins positif) explique l'effet antimitotique de cet agent. Parmi les anomalies recensées en sa présence, des plaques équatoriales désorganisées, des cellules bloquées en métaphase et des fragmentations chromosomiques sont les plus observées tel que le montre la figure 20.



**Figure20** : Anomalies rencontrées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec la colchicine à 1mg/ml (X 400).

**-A-**: Fragmentation chromosomique ; **-B-**: désorganisation de la plaque équatoriale ; **-C-**: Agglutination chromosomique et allongement des noyaux ; **-D-**: Pont chromosomique.

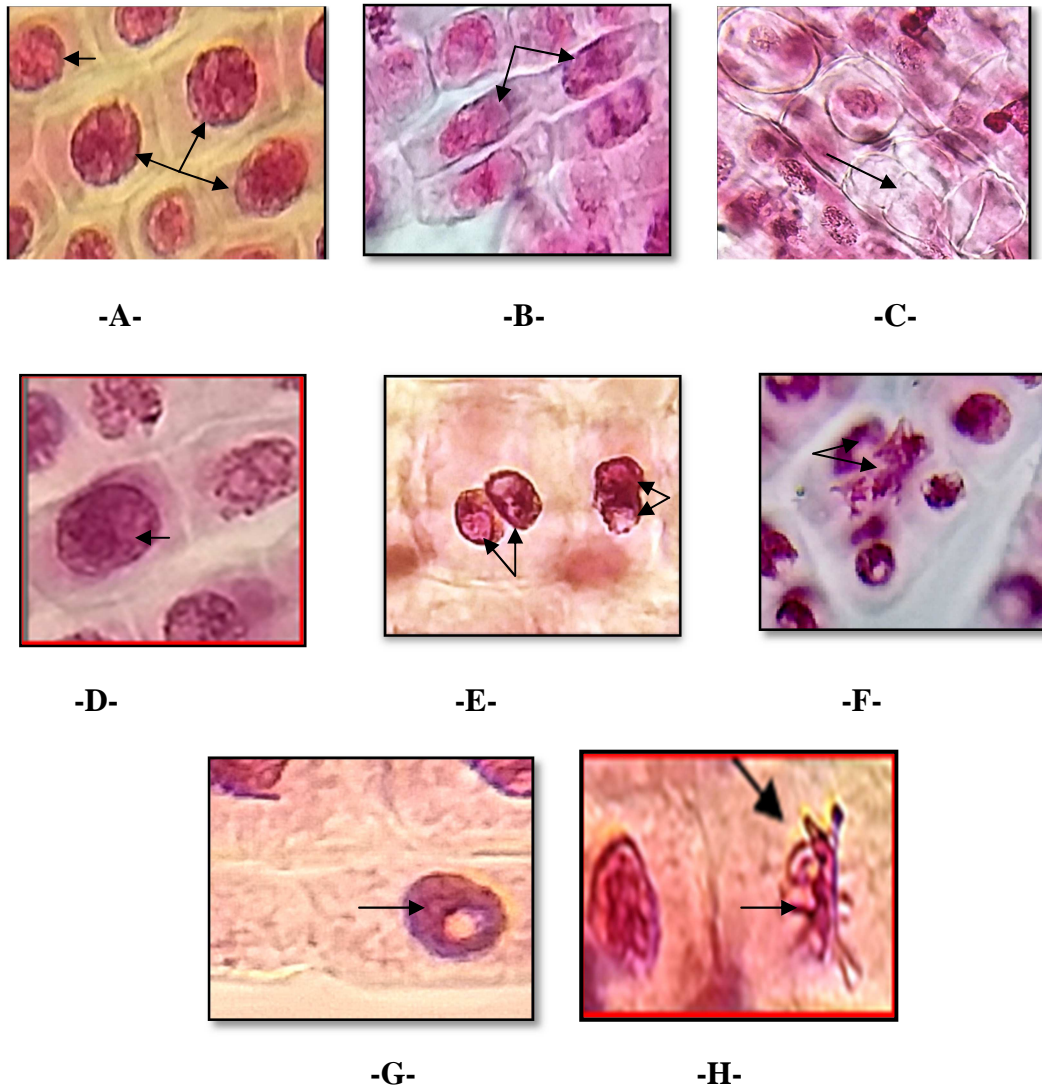
En effet, la colchicine est un alcaloïde végétal qui bloque la formation du fuseau mitotique. Il se fixe sur la tubuline et empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance de ces dernières entraîne le blocage de la mitose au stade de métaphase ce qui explique l'apparition de l'aspect anormal des plaques équatoriales.

La présence de ponts chromosomiques est attribuée aux cassures chromosomiques, au retard de la réplication d'ADN et de l'hétérochromatine ou moment où le noyau est prêt à se diviser et à la présence des chromosomes dicentriques. De tels phénomènes peuvent causer des mutations chromosomiques structurelles (KONUK *et al.*, 2007). D'après YUET *et al.* (2012), ces ponts sont observés chez des cellules d'*Allium cepa* traitées par des extraits aqueux de feuilles d'*Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) et semblent être liés à la présence de quelques terpènes.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### ❖ Anomalies de la mitose en présence d'extraits aqueux de feuilles d'*Erica arborea*

L'observation microscopique a permis la mise en évidence de nombreuses aberrations chromosomiques qui pourraient expliquer les effets de l'extrait aqueux de feuilles sur la division cellulaire, tel que le montre la figure 21.



**Figure 21** : Anomalies rencontrées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux de feuilles d'*Erica arborea* (X 400).

-A-: agglutination chromosomique ; -B-: allongement des cellules avec de gros noyaux ; -C-: cellule sans noyau ;  
-D-: cellule à grand volume cytoplasmique et noyau de taille importante ; -E- Cellules binucléées avec agglutination chromosomique ; -F-: cellule binucléée avec fragmentation chromosomique ; -G-: cellule allongée à grand volume cytoplasmique avec petit noyau à coloration intense ; -H-: désorganisation de la plaque équatoriale .

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

Nos observations ont montré que la plupart des cellules traitées avec l'extrait de feuilles d'*Erica arborea* sont en prophase. L'augmentation du nombre de prophases chez les cellules laisse suggérer que l'extrait végétal pourraient provoquer soit un ralentissement des cellules d'entrer en d'autres stades de mitose notamment en métaphase, soit une altération des microtubules en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade métaphase ou bien même un blocage des cellules en prophase (ROGER, 2007). Certains composés naturels comme certains saponines et flavonoïdes pourraient entraîner une disparition progressive des métaphases, des anaphases et des télophases avec une augmentation relative du nombre de prophases qui disparaissent ensuite peu à peu par retour à l'état interphasique (ABUDUNIA *et al.*, 2017).

Parmi les aberrations chromosomiques observées, les agglutinations chromosomiques et les cellules binucléées sont majoritaires. L'agglutination correspond à des chromosomes ayant un aspect collants (phénomène dit de stickiness). Cette tendance à l'agglutination pourrait être le résultat d'une diminution de la viscosité transformant les molécules allongées en molécules globulaires (MEDJEBER *et al.*, 2018). Elle est probablement causés par une liaison subchromatidique entre les chromosomes, ces derniers perdent la capacité de mouvement et deviennent incapables de parvenir à leur destination finale. Cet aspect collant pourrait aussi résulter de la dépolymérisation d'ADN et de la dissolution des nucléoprotéines suite à un stress, il reflète un état toxique, de type habituellement irréversible et qui mène probablement à une mort cellulaire (BASS *et al.* 2000). Les cellules binucléées quand à elles, sont considérées comme le résultat de l'inhibition de la cytokinèse à n'importe quel point de contrôle du cycle cellulaire (TUROGLU, 2008). D'après ROGER (2007), les microtubules pourraient être la cible de certains flavonoïdes et triterpènes, leur action empêcherait la formation de la plaque cellulaire. Ce phénomène à été observé en utilisant l'extrait de *Paganum harmala* (fleurs) et *Lantana camara* (feuilles) (TURKUGLO, 2008).

L'aspect rétrécis de certains noyaux pourrait être due au changement de la structure des membranes nucléaires, ou bien à une aneuploïdie correspondant à la perte de certains chromosomes (GABARA *et al.*, 2006). De tels phénomènes ont été rencontrés chez les cellules d'*Allium cepa* traitées par l'extrait aqueux d'*Uncaria tomentosa* (KURAS *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les cellules contenant des noyaux volumineux, on pense qu'il s'agit d'une polyploïdie. Ceci pourrait être la conséquence d'endoréduplication ou l'ADN est

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

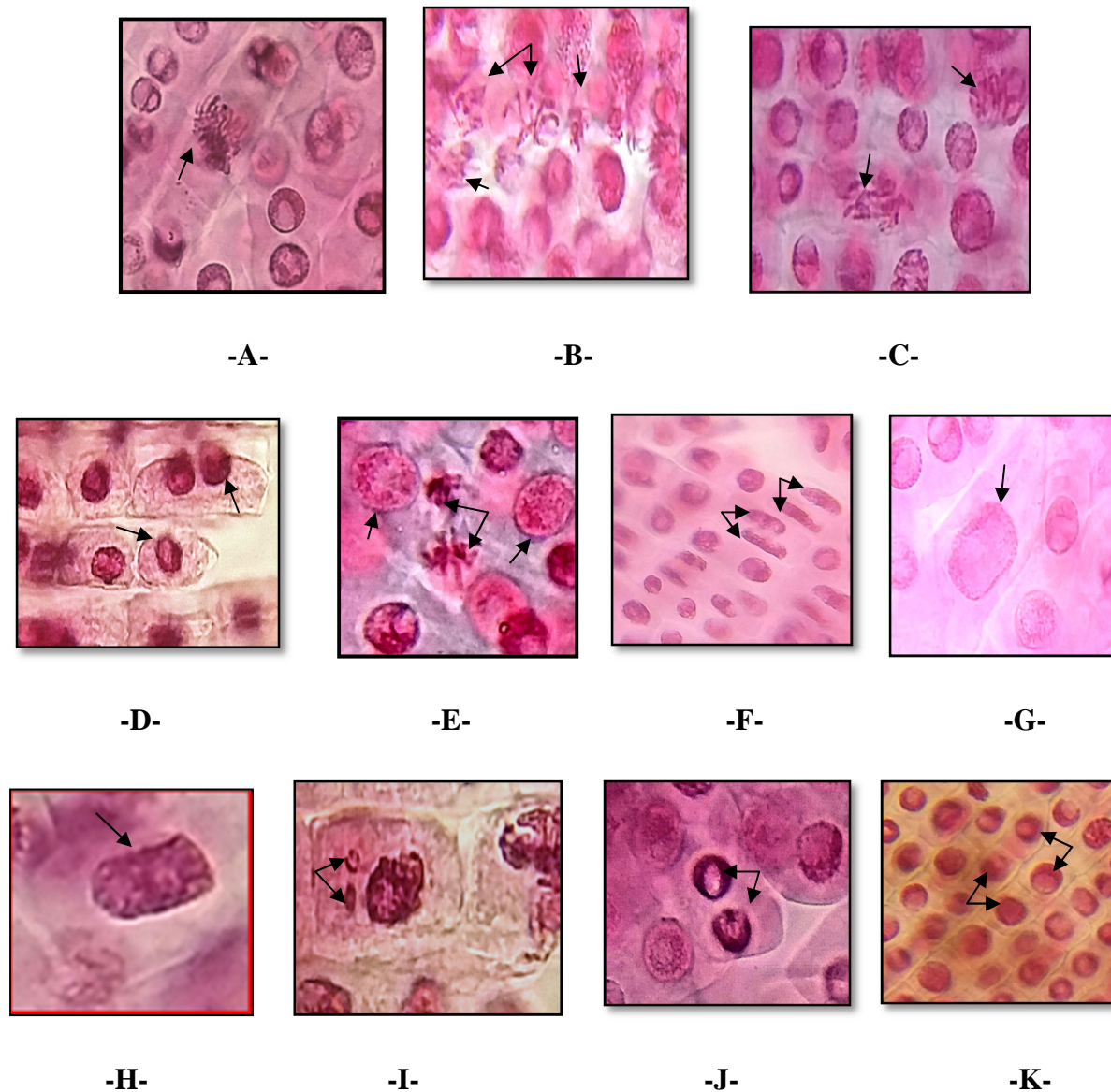
---

dupliqué sans division de la cellule (GABARA *et al.*, 2006). En effet, ABUDUNIA *et al.*, 2017 rapportent que ces phénomènes sont liés à un état de stress, souvent observés lors des traitements avec certains principes actifs médicamenteux (Antipyrine), certains extraits naturels pourraient aussi entraîner de tels effets.

L'effet antimitotique évalué et les différentes anomalies de division cellulaires mises en évidence avec l'extrait aqueux de feuilles d'*Erica arborea* pourraient être expliqués par sa richesse en composés actifs qui peuvent interférer avec le développement normal de la mitose en bloquant le cycle mitotique. La réduction de l'activité mitotique pourrait être due à l'inhibition de la synthèse d'ADN et des nucléoprotéines (HAUHAN *et al.*, 1998). D'après YUET PING (2012), certains phénols et saponines, souvent isolées d'*Erica arborea*, pourraient être impliqués dans ces mécanismes. Certains alcaloïdes comme la lycorine semblent être des inhibiteurs efficaces de la division cellulaire en agissant au niveau de la synthèse de l'acide ascorbique et en affectant la synthèse protéique (tubuline et calmoduline) dont la présence est indispensable pour le bon déroulement de la mitose. L'action de ces agents naturels sur la mitose, Selon SIDDIQUI *et al.* (2007), pourrait être expliquée par modification ou altération de l'expression de certains gènes.

### **❖ Anomalies de la mitose en présence d'extrait aqueux de fleurs d'*Erica arborea***

L'observation microscopique des échantillons traités avec l'extrait floral montre que les anomalies de division cellulaires sont plus fréquentes et plus diversifiées par rapports à ceux traités avec l'extrait de feuilles. Les aberrations chromosomiques observées sont présentées dans la figure 22.



**Figure 22:** Anomalies rencontrées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux de fleurs d'*Erica arborea* (X 400).

-A-: désorganisation de la plaque équatoriale ; -B- : désorganisation des chromosomes avec absence de cytotière ; -C- : Fragmentation Chromosomique ; -D- : éjection du noyau ; -E- : cellules atypiques et désorganisation de la plaque équatoriale ; -F- : allongement des cellules et des noyaux ; -G- : cellule à grand volume cytoplasmique et noyau volumineux ; -H- : cellule à noyau déformé ; -I- : cellule à grand volume cytoplasmique avec des noyaux très réduits ; -J- : cellule binucléée ; -K- : agglutination chromosomique.

Nos observations microscopiques ont révélé que la majorité des cellules anormales sont bloquées en métaphase, avec désorganisation des plaques équatoriales et certaines présentent des fragmentations chromosomiques. Ces anomalies rapprochent l'effet de l'extrait floral d'*Erica arborea* à celui de la colchicine.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

Les cellules qui apparaissent en métaphases laissent suggérer la présence dans l'extrait aqueux des fleurs d'*Erica arborea* de substances actives capables de reproduire l'effet de la colchicine. Ces molécules pourraient avoir un effet mitoclasique empêchant la répartition des chromosomes en 2 lots équivalents suite à l'absence du fuseau mitotique. D'après AIT SAID *et al.* (2015), Un alcaloïde dont la structure ressemble à la vinblastine a été isolé à partir des fleurs d'*Erica terminalis* espèce appartenant au même genre qu'*Erica arborea* semble avoir le même effet sur des cellules méristématiques d'*Allium sativum*, il est probable que les fleurs d'*Erica arborea* contiennent de tel alcaloïdes ce qui expliquerait ces effets antimitotiques.

Les fragmentations chromosomiques correspondent à une destruction des chromosomes. Elles sont probablement dues aux effets clastogènes de l'extrait floral. Ces lésions pourraient résulter, soit directement d'une action sur les bases nucléotidiques, soit par altération du processus de réparation des sites d'ADN endommagé durant la réplication.

L'éjection du noyau survient lorsque le noyau fragmenté ou déformé quitte la cellule. Ce phénomène pourrait aboutir à l'apparition de cellules sans noyaux (ROGER, 2007).

Les noyaux réduits peuvent être originaires des fragments acentriques formés suite à des cassures chromosomiques et chromatidique ou du dysfonctionnement du fuseau mitotique. Ce phénomène implique souvent la perte dans le matériel génétique (SUDHAKAR *et al.*, 2001).

L'étude statistique a révélé une différence hautement significative entre les effets des extraits aqueux des feuilles et des fleurs et le témoin négatif avec des P values respectives de 0.000747 et 0.000008 ce qui démontre un effet antimitotique de nos extraits végétaux nettement supérieurs à celui de l'eau. Cette étude a révélé également qu'il n'existe aucune différence significative entre les effets de la colchicine à 1mg/ml et la dilution 1/4 de l'extrait aqueux des fleurs avec une P-value de 0.8075 nettement supérieure à 0.05. Ceci indique la présence d'un effet antimitotique de cette dilution similaire à celui de la colchicine. Le test de Newman-Keuls rassemble les effets de la dilution 1/4 de l'extrait floral et de la colchicine dans le même groupe homogène (annexe 4).

### **2.2. Étude de l'activité antiproliférative**

L'activité antiproliférative et cytotoxique des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea* sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* est déterminée par le test MTT à (560 nm). Cette analyse est basée sur la mesure des densités optiques (DO) proportionnelles au nombre de cellules vivantes. Les DO obtenues sont regroupées en annexe 5. A partir de ces valeurs, des taux de viabilité et de mortalité des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* ont été déterminés et résumés dans le tableau suivant:

**Tableau VIII** : Taux de viabilité et de mortalité de cellule de *Saccharomyces cerevisiae* en contact des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.

<b>Echantillon</b> <b>Taux</b>	<b>Témoin</b> <b>négatif</b>	<b>standard</b> <b>(quercétine)</b>	<b>Extrait aqueux</b> <b>des feuilles</b>	<b>Extrait aqueux</b> <b>des fleurs</b>
<b>Taux de viabilité</b>	100%	76.06 %	86.65%	89.10 %
<b>Taux de mortalité</b>	00%	23.94 %	13.35%	10.9%

La quercétine a présenté un taux de mortalité des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* égal à 23.94%. Tandis que ce taux est de 13.35% pour l'extrait aqueux des feuilles et de 10.9% pour celui des fleurs.

Un effet inhibiteur similaire avec des taux de mortalité entre 10 et 17 % a été signalé par LACIKOVA *et al.*, 2009 et ELYOUBI *et al.*, 2012. Ces auteurs ont étudié l'effet des extraits aqueux de *Staphylea pinnata* (Staphyleaceae) et de *Tetraena gaetula* (Zygophyllaceae) sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et des cellules tumorales cutanées. Des taux de mortalité inférieurs à 5% ont été retrouvés avec des extraits de certaines espèces appartenant aux familles des Euphorbiaceae, des Lamiaceae et des Ericaceae (ANEB, 2017). Cependant, LALAOUI *et al.* (2004) et AIT SAID *et al.*(2015) ont travaillé sur des levures et des lignées tumorales humaines traitées avec des extraits et des huiles essentielles de nombreuses espèces végétales comme *Origanum compactum* et *Erica multiflora*. Ces auteurs ont obtenu des taux de mortalité nettement supérieurs à ceux que nous avons obtenu et qui sont de 50 à 79 % .

L'activité antiproliférative et cytotoxique est le résultat de l'inhibition de la croissance cellulaire sous l'action d'un principe actif agissant pendant un temps donné

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

(LALAOUI *et al.*, 2004). L'effet antiprolifératif de la quercétine, utilisée comme standard, a été largement démontré. Il s'agit d'un flavonoïde de type flavonol qui semble agir directement par inhibition de la protéine kinase (CPK) (LALAOUI *et al.*, 2004) ou indirectement par son effet antioxydant (AY *et al.*, 2007 et NÖTHLINGS *et al.*, 2007).

*Erica arborea* est connue par sa richesse en certains phénols, terpènes et saponosides triterpénique dont l'activité cytotoxique a été largement évoquée à travers la littérature (FIOT *et al.*, 2005 ; NÖTHLINGS *et al.*, 2007 et ANEB 2017). Il semble que les saponosides pourraient provoquer une mort cellulaire en agissant au niveau de la membrane mitochondriale (KOUAME *et al.*, 2009). Des études *in vitro* ont montré que certains flavonoïdes peuvent activer la cascade pro-apoptotiques et provoquer l'apoptose. La naringénine est un flavonoïde du groupe des flavanones qui est capable d'activer les caspases et inhiber les enzymes de réparation d'ADN. Tandis que d'autres flavonoïdes comme la lutéoline, la quercétine, le kaempférol, l'apigénine et la taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse. Par ailleurs, l'acide ellagique (composé phénolique) pourrait affecter l'expression de P53 et P21 ce qui provoquerait l'arrêt de la croissance cellulaire en G1 (MARTIAL, 2012). Il semble que certains métabolites secondaires pourraient exercer un effet cytotoxique sur les levures en agissant sur les complexes TOR (Target Of Rapamycin). Les protéines kinases TOR contrôlent une grande variété de fonctions cellulaires impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire (BJORNSTI et HOUGTON, 2004).

Hormis sa richesse en composés cytotoxiques, *Erica arborea* contient aussi d'autres métabolites secondaires qui pourraient avoir diverses activités biologiques. En effet, cette richesse laisse suggérer que certains composés pourraient assurer la protection des cellules en exerçant un effet anticytotoxique (ANEK, 2017). D'autre part, la glycosylation des flavonoïdes pourrait bloquer leur entrée dans les cellules de levures et limiter leur action antiproliférative (BJORNSTI et HOUGTON, 2004). Cette glycosylation ainsi que la composition phytochimique d'*Erica arborea* pourraient expliquer le faible taux de mortalité obtenu lors de notre étude.

# **Conclusion générale**

## CONCLUSION GENERALE

---

*Erica arborea* est une plante médicinale très connue pour ses vertus thérapeutiques. Ses différentes parties sont utilisées dans le traitement de diverses pathologies microbiennes, physiologiques et inflammatoires. Dans cette étude nous nous sommes intéressées à l'évaluation des activités antimittotique et antiproliférative des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de cette plante. L'effet antimittotique de ces extraits a été déterminé par l'évaluation des indices mitotiques (IM) sur des cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Quand à l'effet antiprolifératif, il a été évalué sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* par le test antiprolifératif-MTT.

Il en ressort que les extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea* affectent la mitose et exerce un effet antimittotique sur les cellules méristématique d'*Allium cepa*. Ils ont induit une diminution significative des indices mitotiques par rapport aux cellules du témoin négatif pour toutes les dilutions testées. Cette diminution est plus importante pour l'extrait floral. Notre étude a révélé aussi des effets antimittotiques similaires entre la dilution 1/4 de l'extrait aqueux des fleurs et la colchicine à 1 mg / ml, considérée comme un antimittotique d'origine végétale de référence. Le recensement des anomalies de la mitose par observation microscopique montre que chaque extrait aqueux agit sur la mitose selon un mode d'action différent. L'extrait de feuilles affecte la prophase et induit notamment des agglutinations et des cellules binucléées, tandis que l'extrait floral affecte la métaphase et provoque surtout des fragmentations chromosomiques.

Cependant, ces extraits aqueux n'induisent que des faibles taux de mortalité des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et qui sont de 13.35 % pour l'extrait aqueux des feuilles et 10.9 % pour celui des fleurs.

A l'issu de ces résultats, nos perspectives s'inscrivent dans le but de mieux cerner les effets antimittotique et antiprolifératif des extraits d'*Erica arborea*. Pour cela il serait intéressant:

- de tester l'effet de ces extraits sur des lignées tumorales *in vitro* et *in vivo* ;
- de tester l'effet des extraits alcooliques (extraits éthanoliques) ;
- d'identifier les différents principes actifs responsables des ces effets ;
- de comprendre leurs modes d'actions.

# **références bibliographiques**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. **ABUDUNIA A. N., MARMOUZI L., FAOUZI M., RAMLI Y., TAOUFIK J., EL MADANI N., ESSASSI E., SALAMA A., KHEDID K. M., ANSAR F. and IBRAHIMI A. (2016).** Anticandidal, Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Calendula arvensis* Flowers. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **27(1)**, 90-97.
2. **AIT SAID A., AMEZOUAR F., BOURHIM M., AMMAYEN K et HAMIDI M. (2015).** Genotoxic and Antiproliferative Activities of Some Ericaceae Plants of Morocco. *Journal of Applied Biosciences*, **100**, 12-16.
3. **AIT YOUSSEF M. (2006).** Plantes Médicinales de Kabylie. 1<sup>ERE</sup> Ed., Elbis Press, Paris, France. P. 37–38.
- AKINBORO A. and BAKARE A. (2007).** Cytotoxic and Genotoxic Effects of Aqueous Extracts of Five Medicinal Plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**, 470-475.
4. **AKKOL E., YESILADA A. and GUVEN C.A. (2007).** Evaluation of anti-inflammatory and antinoceptive Activities of *Erica* Species Native to Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, **116 (2)**, 251-257.
5. **AMEZOUAR F., BENAÏSSA M., HSAÏNE M., BADRI W., BOURHIM N. and FOUGRACH H. (2010).** Contribution to the Valorization of Natural Moroccan Resources. Phytochemical and Biological Study of the Sheets of *Erica arborea* L. Collected in Area of Taza. *Gestion Environnementale des Produits Chimiques Proceedings (GEPROC4)*, **2(1)**, 1-10.
6. **AMEZOUAR F., BADRI W., HSEÏNE M., BOURHIM M. and FOUGRACH H. (2013).** Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Moroccan *Erica arborea* L. *Pathology- Biology*, **61(6)**, 254-258.
7. **ANEB M., TALBAOUI A., BOUYAHYA A., EL BOURY A., AMZAZI H., AKKA S. and BAKRI N. (2017).** *In Vitro* Cytotoxic and Antimitotic Effects, Antibacterial Activity of some Moroccan Medicinal Plants. *European Journal of Medicinal Plants*, **16(2)**, 167-187.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

7. **ARRAKI K. (2014).** Les Stilbénoides chez les Cypéracées: Isolation, Identification et Etude de leurs Activités Biologiques. Identification et Dosage des Stilbènes dans des Vins Tunisiens. Thèse de doctorat en Sciences Alimentaires. Université de Tunis, Tunisie. P.63.
8. **AY M., BAHADORI F., ÖZTÜRK M., UFUK KOLAK C. and TOPÇU G. (2007).** *Antioxidant Activity of Erica arborea. Fitoterapia, 78, 571–573.*
9. **BAHADORI F., ÖZTÜRK M., UFUK KOLAK C. et TOPÇU G. (2007).** Activités Biologiques et Etude Phytochimiques de Quelques Plantes de la Roumanie. *International Journal of Phytotherapy, 77, 260-266.*
10. **BASS H.W., NAGAR S., HANLEY-BOWDOIN L. et ROBERSTON D. (2000).** Chromosome Condensation Induced by Geminivirus Infection of Mature Plant Cells. *Journal of Cell Science, 113, 1149-1155.*
11. **BAYER E., BUTTLER K.P., FINKENZELLER X. et GRAU J. (2005).** Guide de la flore Méditerranéenne (Caractéristiques, Habitat, Distribution et Particularités de 536 espèces). 1<sup>ère</sup> Ed., Delachaux et Niestlé, Paris, France. P. 212-214.
12. **BECKERS T. and MAHBOODI S. (2003).** Natural, Semisynthetic and Synthetic Microtubule Inhibitors for Cancer Therapy. *Drugs of the Future, 28, 767-785.*
13. **BENAMAR M., MELHAOUI A., ZYAD A., BOUABDALLAH I. and AZIZ M. (2009).** Anticancer Effect of two Alkaloids: 2R and 2S-bgugaine on Mastocytoma P815 and Carcinoma Hep. *Natural Product Research, 23, 659-664.*
14. **BENNANI M., JEAN FIETB H. et ADLOUNIA A. (2009).** Impact des Huiles Essentielles sur le Cancer de la Prostate: Etude de l'Effet Antiprolifératif des Polyphénols. *Revue Francophone Des Laboratoires, 56 (2), 23-26.*
15. **BESSAH R. and BENYOUSSEF E.H. (2014)** Essential Oil Composition of *Erica arborea L. Leaves From Algeria*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants, TEOP, 17 (5), 931 – 935.*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

16. **BESSAH R. et BENYOUSSE E. (2015).** La filière des Huiles Essentielles. Etat de l'Art, Impacts et Enjeux Socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*, **18 (3)**, 513 – 528.
17. **BHALKAR N., PATIL M. et SANJAY P. (2016).** Camptothecine Production by Mixed Fermentation of two Endophytic Fungi from *Nothapodytes nimmoniana*. *Fungal Biology*, **120**, 7.
18. **BJORNSTI M.A. and HOUGHTON (2004).** A Target for Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 335-341.
19. **BOSETTI C., SPERTINI L., PARPINEL M., GNAGNARELLA P., LAGIOU P., NEGRI E., FRANCESCHI S., LA VECCHIA C. MONTELLA M., PETERSON J., DWYER J. and GIACOSA A. (2005).** Flavonoids and Breast Cancer Risk in Italy. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **14**, 805-808.
20. **BOUBAKER A., KAYOULI L. et BULDGEN A. (2004).** Composition Chimique et Teneur en Composés Phénoliques des Espèces Arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **64 (1)**, 315-317.
21. **BOUCHER C. et DOUX Y. (2011).** Guide Des Arbres et Arbustes de Méditerranée. 2<sup>ème</sup> Ed., Delachaux et Niestlé, Paris, France. P. 319-320.
22. **BOYE O., GETAHUN Z., GROVER S., HAMI E. and BROSSI A. (1993).** Synthesis of C14 Labelled Electrophilic Ligands of the Colchicine Binding site of Tubulin: Chloroacetates of Demethylthiocolchicines and of Acetylcolchinol, Isothiocyanate of 9-deoxy-N-acetylcolchinol. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **33**, 293-299.
23. **BROSSE J. ( 2010).** Larousse des Arbres, 2<sup>ème</sup> Ed., Janine Faure et Véronique Taho, Madrid, Espagne. P. 17-176.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 24. CARMICHAEL J., DE GRAFF W.G., GAZDAR A.F., MINNA J.D. and MITCHELL J.B. (1987).** Evaluation of Tetrazolium–Based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity. *Cancer Research*, **47**, 943 –946.
- 25. CASAGRANDE F. and DARBON J. M. (2001).** Effects of Structurally Related Flavonoids on Cell Cycle Progression of Human Melanoma Cells: Regulation of Cyclin-Dependent Kinases CDK2 and CDK1, *Journal of Biochemical Pharmacology*, **61**, 1205-1215.
- 26. CHEVALIER A. (2008).** Note Sur *Erica arborea* et sur l’Emploi de ses Souches Pour la Fabrication des Pipes. *Revue de Botanique Appliquée et d’Agriculture Coloniale*, **74**, 649-656.
- 27. CHIKHI K. (2016).** Bruyère Blanche: Vertus Therapeutiques Divers. *Phytothérapie*, **14**, 57-60.
- 28. DABYDEEN D., FLORENCEG., PATERSON I. et HAMEL E. (2004).** Cancer Chemotherapy. *Review of Pharmacology*, **53**, 397-403.
- 29. DEJOS C. (2014).** Etude des Propriétés Antiprolifératives d'une Substance Naturelle et Rôle de la Signalisation Calcique Dans la Différenciation des Photorécepteurs. *Chimie Biologique INRA*, **217(15)**, 11094-11099.
- 30. DERBEL S. (2005).** Les Phytonutriments et leur Impact sur la Santé. *Phytothérapie*, **3(1)**, 28–34.
- 31. DEYSSON G. (1970).** Sur l'Utilisation des Méristèmes Radiculaires Pour L’Etude d'Actions Antimitotiques. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **1**, 95-110.
- 32. DIALLO A. et PRIGENT C. (2011).** Les Sérine/Thréonine Kinases Contrôlant la Progression du Cycle Cellulaire Comme Cibles Thérapeutiques. *Bulletin du Cancer*; **98**, 1335-1345.
- 33. DOLISI G. (2009).** Biologie 11. 1<sup>ère</sup> Ed. Chenelière Education. Montreal, Canada. P. 199-205.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 34. DONG Z., SAIKUMAR P., WEINBERG J.M. and VENKATACHALAM M.A. (1997).** Internucleosomal DNA Cleavage Triggered by Plasma Membrane Damage During Ecroti Cell Death. Involvement of Serine but not Cysteine Proteases. *American Journal of Pathology*, **151**, 1205-1213.
- 35. DOXSEY S., ZIMMERMAN W. and MIKULE M. (2005).** Centrosome Control of the Cell Cycle. *Trends in Cell Biology*. **15(6)**, 303-311.
- 36. DRISSI A, BENNANI H. and GITON F. (2016).** Tocopherols and Saponins Derived From Some Moroccan Plants Exert an Antiproliferative Effect on Human Prostate Cancer. *Cancer Investigation* **24 (6)**, 588-92.
- 37. DUFFOUR C., LAPRAZ J.C. et CHEMLI R I. (2007).** La Plante Médicinale de la Tradition à la Science. Congrès Intercontinental. Tunis. 3<sup>ème</sup> Ed., Granch, Paris, France. P. 222-223.
- 38. DURAND P., PROST M. et CHIRL M. (2001).** Stress Oxydant et Pathologies Humaines. *La Presse médicale*, **3**, 1076-1081.
- 39. EL YOUBI A., BOUSTA D., JAMOUCSI B., GRECHE H., EL MANSOURI E., BENJILALI J. et SOIDROU S.H. (2012).** Activités Antioxydante, Apoptotique et Antiproliférative de *Tetraena gaetula* et de *Berberis hispanica* Originaires du Maroc. *Phytothérapie*, **10 (1)**, 151–160.
- 40. FALSA B. (2009).** Potentiel antimittotique et génotoxique des plantes médicinales et analyse phytochimique. *Annales de l'institut national d'agronomie (INA)*, **3**, 7-19.
- 41. FAVIER A. (2003).** Le Stress Oxydant: intérêt Conceptuel et Expérimental dans la Compréhension des Mécanismes des Maladies et Potentiel Thérapeutique. *Journal de la Société Chimique Française*, **270**, 108-115.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

42. FINK B.N., STECK S.E., WOLFF M.S., BRITTON J.A., KABAT G.C., GAUDET M.M., ABRAHAMSON P. E., BELL P., SCHROEDER J. C., TEITELBAUM S. L., NEUGUT A. I. and GAMMON M.D. (2007). Dietary Flavonoid Intake and Breast Cancer Survival Among Women on Long Island. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **16**, 2285-2292.
43. FIOT J., SANON S., AZAS N., MAHIOU V., JANSEN O., ANGENOT L., BALANSARD G. and OLLIVIER E. (2006). Phytochemical and Pharmacological Study of Roots and Leaves of *Guiera Senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **106**, 173-178.
44. GABARA A., KALWINEK J., ZAKOWSK Z. and BRYCKI B. (2006). Influence of N, N-Bis (Aminopropyl) Dodecylamine on the Ultrastructure of Nuclei in *Aspergillus Niger* Mycelium and on Cell Proliferation and Mitotic Disturbance in *Allium cepa*. Root Meristem. *Actabiologica Cracoviensia, Series Botanica*, **48 (1)**, 45-52.
45. GHEDIRA K. (2006). La Nigelle Cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **4**, 1-7.
46. GIGANT B., WANG C., RAVELLI R. B., ROUSSI F., STEINMETZ M. O., CURMI P. A. and SOBEL A. (2005). Structural Basis for the Regulation of Tubulin by Vinblastine. *Nature*, **435**, 519-522.
47. GUENDOUZE-BOUCHEFA N., MADANI K., CHIBANE M., BOULEKBACHE-MAKHLOUF L., HAUCHARD D., KIENDREBEOG M., STÉVIGNY C., NDIJOLO OKUSA P. and DUEZ P. (2015). Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Three Ericaceae from Algeria. *Industrial Crops and Products* **70**, 459–466.
48. GUIGNARD J.L., COSSON L. et HENRY M. (1985). Abrégé de Phytochimie. 1<sup>ère</sup> Ed., Masson, Paris, France. P. 216-217.
49. GUIGNARD J.L. (2001). Botanique Systématique Moléculaire. 12<sup>ème</sup> Ed., Masson, Paris, France. P. 290 -291.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 50. GUILLAUME J. L. (2008).** Abrégé de Botanique. 1<sup>ère</sup> Ed., Masson, Paris, France. P. 212-214.
- 51. HAMIM H., LUCIE MICHE B., AHMED DOUAÏK C., MRABET R., OUHAMMOU A., ROBIN D. and HAFIDI M. (2017).** Diversity of Fungal Assemblages in Roots of Ericaceae in Two Mediterranean Contrasting Ecosystems. *Académie des Sciences, Elsevier Masson SAS*, **1**, 1-12.
- 52. HARNAFI H., BOUANANI, N., AZIZ, M., CAID H.S., GHALIM, N. and AMRANI S. (2007).** The Hypolipidaemic Activity of Aqueous *Erica multiflora* L. Flowers extract intriton WR-1339 Induced Hyperlipidaemic rats: a Comparison with Fenofibrate. *Journal of Ethnopharmacology*, **190 (1)**, 156–160.
- 53. HAUHAN K., MISHIRO A., OZAWA K., SUGIYAMA M. and IKEDA A. (1998).** Convenient Method for the Evaluation of Anti-Tumor Agents Affecting the Cell Cycle. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90 (5)**, 574-576.
- 54. KARP G. (2004).** Biologie Cellulaire et Moléculaire. 2<sup>ème</sup> Ed., De Boeck Université, Bruxelles, Belgique. P. 213.
- 55. KONUK M., LIMAN R. and CIGERVI H. (2007).** Termination of Genotoxic effect of Boron on *Allium cepa* Root Meristematic Cells. *National Agricultural Research Centre (NARC)*, **39 (1)**, 73-79.
- 56. KOUAME J., GNOULA C., PALE E., BASSOLE H., GUISSOU I.P., SIMPORE J. et NIKIEMA B. (2009).** Cytotoxicité d'Extraits de Feuilles et de Galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (*Combretaceae*). *Science et Technique, Sciences de la Santé*, **32(2)**, 9-23.
- 57. KOUMARE M., CROS J. et PITET G. (1998).** Recherches sur les Constituants Chimiques de *Guiera senegalensis*. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, **2**, 204-209.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 58. KURAS M., NOWAKOWSKA J., SLIWINSKA E., PILARSKY R., ILASZ R E and ZOBEL A. (2006).** Changes in Chromosome Structure, Mitotic Activity and Nuclear DNA Content from Cells of *Allium Test* Induced by Bark Water Extract of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 211-221.
- 59. LACIKOVA L., JANCOVA M. et MUSELIK J. (2009).** Antiproliferative, cytotoxic, antioxidant activity and polyphénols contents in leaves of four *Staphylea* L. species. *Molecules*, **14(9)**: 3259-3267.
- 60. LALAOUI K., MZIBRI L., LAGET M., GUIRAUD-DAURIAC H., DUMENIL G. et HMAMOUCHE H. (2004).** Effet Antiprolifératif des Plantes Médicinales sur une Lignée Cancéreuse du Col de l'Utérus. *Maroc Médical*, **26 (2)**, 90-94.
- 61. LE GRAND M. (2015).** La protéine Akt, Lien entre Mitochondries et Microtubules dans le Mécanisme d'Action des Agents Anti-Microtubules. *Revue d'oncologie*, **2**, 36-39.
- 62. LHUILLIER A. (2007).** Contribution A l'Etude Phytochimique de Quatre Plantes Malgaches. Doctorat en Transferts, Dynamique des Fluides, Energie et Procédés. Spécialité: Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. P. 200.
- 63. LOBSTEIN A., COUIC MARINIER F., BRIOT C. et JACTAN J.P. (2017).** Les Huiles Végétales et Cancer (Laurier Noble). *Actualité pharmaceutique, ScienceDirect*, **57**, 57-60.
- 64. LONGUEFOSSE J.L. ( 2003).** 100 Plantes Médicinales de la Caraïbe. 2<sup>ème</sup> Ed. Gondwana, Gros-Morne, France. p. 176-177.
- 65. LUGASI A., HOVARI J., SAGI K.V. and BIROL. (2003).** The Role of Antioxidant Phytonutrients in the Prevention of Diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47**, 119-125.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 66. MARCANO L., CARRYO I., FERNANDEZ Y. and TORREALBA Z. (2006).** Determination of Vanadium Accumulation in Onion Root Cells and its Correlation with Toxicity. *Biocell Center*, **30**, 259-267.
- 67. MARTIAL M.Y. (2012).** Potentiel Antioxydant et Cytotoxicité d'extraits de Feuilles et de Rameaux de *Salvadora persica L.* (Salvadoraceae). *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine (CAMES)*, **7 (2)**, 16-18.
- 68. MARTINET O., POMMIER P., SCLOSSMACHER P. DEVELAY A. et HARO L. (2005).** Intoxication par Bois de gale (*Agauria salicifolia*) et Effet Cytotoxique. *Journal de Botanique*, **34 (11)**, 797-798.
- 69. MBAYO K., KALMONA E.M., MU YA R., TSHISAND P.T., MASEHO F., KIHUYA E.N., BAKARI S. et KAHUMBA J.B. (2016).** Test d'Activité Antimitotique et Etude Chimique Préliminaire de Quelques Euphorbiaceae Du Katanga Méridional (RDC). *Journal de Phytothérapie*, **23**, 1-13
- 70. MEDJEBER M., SAADOUN N. et SAIDI F. (2018).** Activité Antimitotique de deux Espèces d'*Aspergillus*: Mycoendophytes Foliaires De *Limoniastrum Feei* (Girard) Batt. d'Oued Aghlal (Bechar, Algérie). *Revue Agrobiologia*, **8(1)**, 871-878.
- 71. MIOARA T., NAVROTESCU A., OVIDIU C. et TOMA K. (2005).** Influence de la Propolis Sur La Mitose dans le Méristème de *Secale Cereale L.* Annales de génétique et Biologie Moléculaire. Université Alexandru Ioan Cuza, Roumanie, **5**, 51-52.
- 72. MOREAUD. (2006).** Etude de Nouvelles Cibles Moléculaires du Cancer Broncho Pulmonaire non à Petites Cellules Pharmacomodulées par des Substances Originales Naturelles et Synthétiques. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé. Spécialité: Cancérologie Pré-Clinique. Univiversité de Nante. France. P. 68-69.
- 73. MULLINS J.M. and MCINTOSH J.R. (1982).** Isolation and Initial Characterization of the Mammalian Midbody. *Journal of Cell Biology*. **94(3)**, 654-61.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 74. NAYEBI A.M., NAZEMIYEH H., OMIDBAKHSR R., and ÇOBANOĞLU S. (2008).** Analgesic Effect of the Methanol Extract of *Erica arborea* (L.) in Mice Using Formalin Test, *DARU*, **16 (4)**, 229-232.
- 75. NOGALES E., WHITTAKER W., MILIGAN R. and DOWNING K. (1999).** High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell*, **96**, 79-88.
- 76. NÖTHLINGS U., MURPHY S.P., WILKENS L.R., HENDERSON B.E. et KOLONEL L. (2007).** Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: the Multiethnic Cohort Study. *Journal of Epidemiology*, **166(8)**, 924-931.
- 77. OUSTRIN M., MOISAND C., CROS M. et FOULQUIER F. (2014).** Etude de la Cytotoxicité à l'aide du test *Allium* de Dérivés de l'Urée. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **20**, 189-202.
- 78. PARIS M. et HURABIELLE M. (1981).** Abrégé de Matière Médicale. Pharmacognosie. Tome I. 1<sup>ère</sup> Ed. Masson, Paris. France. P. 339.
- 79. PAWELETZ N. (2001).** Walther Flemming: Pioneer of Mitosis Research. *Journal of Cell Biology*, **2(1)**, 72-75.
- 80. PIETTA P.G. (2000).** *Flavonoids as Antioxidants*. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035-1042.
- 81. RHATTAS M. (2016).** Etude Ethnobotanique des Plantes Médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif Occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, **97**, 36-37.
- 82. ROBERT J. (2010).** Signalisation Cellulaire et Cancer, Collection Oncologie Pratique, Springer-Verlag, Paris, France. P. 199-202.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 83. SAVRY A. (2012).** Impact des Protéines de la Famille BCL-2 dans l'Induction de l'Apoptose par les Agents Anti-Microtubules. Thèse de doctorat en Pathologie humaine – Oncologie. Université de Marseille. France. P. 39-41.
- 84. SIDDIKI S., MAGHVANSI M.K. and HASSAN Z. (2007).** Cytogenetic Change Induced by Sodium Azide On *Trigonella foenum-graecum L.* Seeds. *South African Journal of Botany*, **73**, 632-635.
- 85. SHIVASHARANAPPA K. and LONDONKAR R. (2014).** Clot Lysis and Antimitotic Study of *Ficus glomerata* Roxb Fruit Extracts. *International Scholarly Research Notices (ISRN)*, **20**, 1-4.
- 86. SNYDER J. P., NETTLES J. H., CORNETT B., DOWNING K.H. and NOGALES E. (2001).** The Binding Conformation of Taxol in beta-tubulin: a Model Based on Electron Crystallographic Density. *American National Academy of Sciences*, **98**, 5312-5316.
- 87. SOUNOUGOU H. (2012).** Effets Cytotoxiques de la Plante *Abrus precatorius L.* *Sciences et Nature*, **8 (1)**, 2–6.
- 88. SUDHAKAR R., NINGE GOWDA K. and VENU G. (2001).** Mitotic Abnormalities Induced by Silk Dyeing Industry Effluents in the Cells of *Allium cepa*. *Cytologia*, **66**, 25-239.
- 89. TEUSCHER E., LOBSTEIN A. et ANTON R. (2017).** Plantes Aromatiques, Epices, Aromates, Condiments et Huiles. 3<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier, Paris, France. P. 203-204.
- 90. TIGRINE C. (2014).** Effets Anticancéreux et Chimio-protecteur de l'Extrait Polyphénolique, Riche en Flavonoïdes, des Feuilles de *Cléome arabica*. Doctorat en sciences biologiques, spécialité: Biochimie. Université Ferhat Abas, Sétif I, Algérie. P. 111-119.
- 91. THIFFULT N. (2015).** Ericaceae et Régénération Forestière Sous Enquête. *Bulletin du ministère des ressources naturelles et de la faune*, Québec, Canada, **1**, 103-130.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- 92. TURKUGLO S. (2008).** Molecular Controls of Growth Arrest and Apoptosis: Dependent and Independent Pathways. *Oncogene*, **11**, 199-210.
- 93. WANI M. C., TAYLOR, H. L. and WALL, M. E. (1971).** Plant Antitumour Agents. VI. The Isolation of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society (JACS)*, **93**, 2325-2327.
- 94. YAHIAOUI K. (2016).** New Synthesis of Two Tridentate Bipyrazolic Compounds and Their Cytotoxic Activity Tumor Cell Lines. *Natural Product Research*, **21 (11)**, 947-952.
- 95. YUET PING K., DARAH I., USUF U. and SASIDHARAN S. (2012).** Genotoxicity of *Euphorbia Hirta* on *Allium Cepa* Assay. *International Conference on Nutrition and Food Sciences (IPCBE)*, Singapore, **39 (1)**, 222-225.

# **Annexes**

# ANNEXES

## Annexe 1

### Matériel de laboratoire utilisés

type	Matériel
Verrerie	tubes à essais, flacons, béchers, tubes en connes, boîtes de pétri, lames et lamelles
Appareillage	Balance, Appareil photo, vortex, agitateur, étuve et autoclave.
Autres	micropipette électronique embouts stériles, ciseau, pince, filtres de 0.22m de diamètre

## Annexe 2

### Milieu de culture pour *Saccharomyces cerevisiae*

#### • Composition chimique

Les éléments constitutifs pour un litre de milieu de culture sont les suivants:

Bactopeptone :	10 g
Glucose :	25 g
Eau distillée stérile :	700 ml
Tampon phosphate (pH = 3.8) :	300 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O) :	26.88
Acide citrique :	17.6 g

#### • préparation du milieu de culture

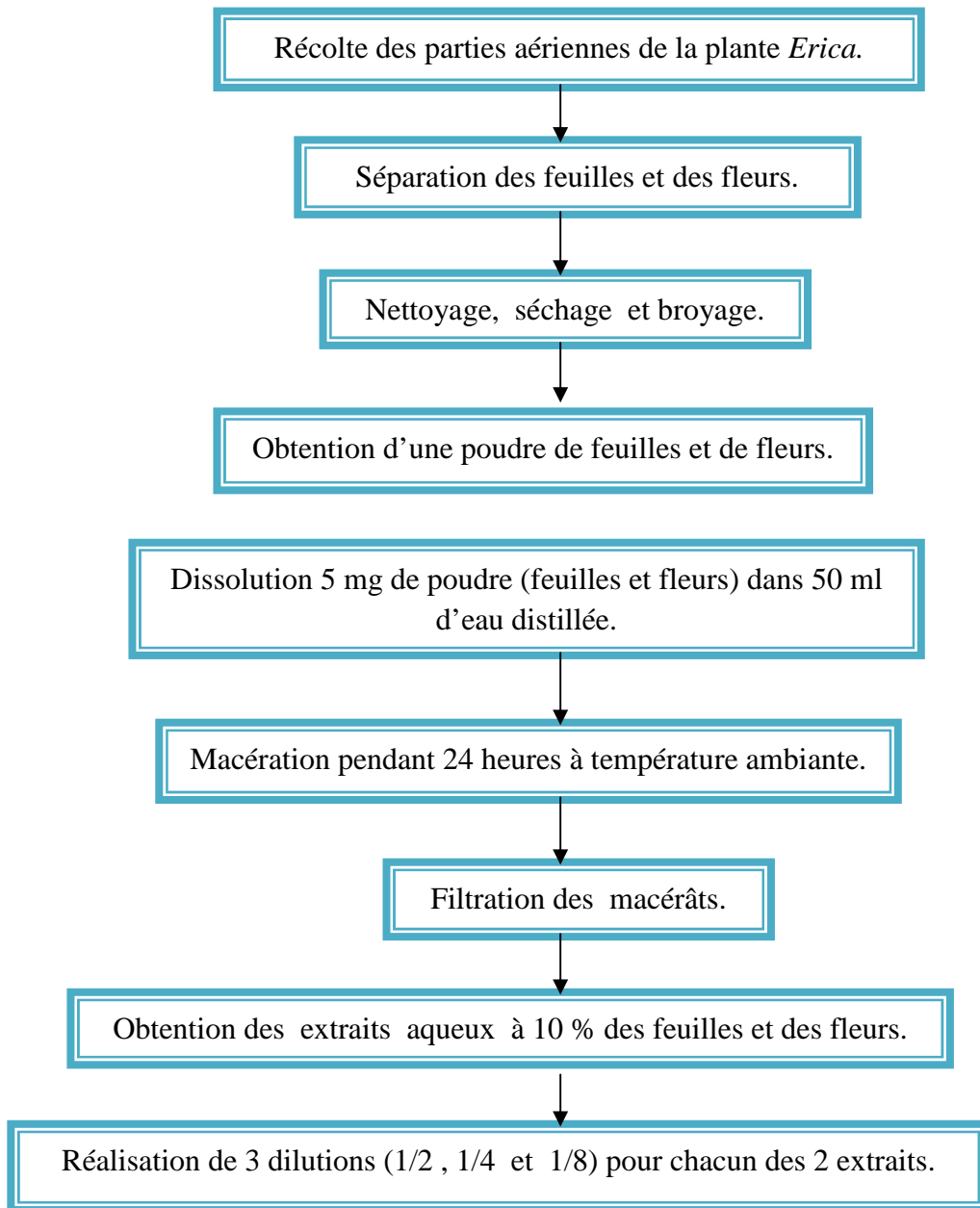
Les différents constituants sont mélangés et ajustés avec de l'eau distillés jusqu'au volume de 1000 ml. Ce mélange est ensuite agité à l'aide d'un agitateur, des flacons en verre sont remplis puis autoclavés à 120 C<sup>0</sup> pendant 20 mn.

# ANNEXES

---

## Annexe 3

### Les principales étapes d'extraction aqueuse



# ANNEXES

## Annexe 4

Résultats de l'étude statistique de l'activité antimitotiques des extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea*.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour IM (2 EME ECHANTION) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	74557,92	1	74557,92	1490,820	0,000000
Echantillon	3188,29	3	1062,76	21,250	0,000008
Erreur	800,18	16	50,01		

(A): Comparaison des effets des 3 dilutions de l'extrait floral et le témoin négatif

Effet	Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	51748,02	1	51748,02	1029,785	0,000000
Dilution	1440,62	3	480,21	9,556	0,000747
Erreur	804,02	16	50,25		

(B): Comparaison des effets des 3 dilutions de l'extrait de feuilles et le témoin négatif

Cellule N°	ECH	Test de Newman-Keuls ; variable IM (FLEURS 1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 21,473, dl = 16,000	
		IM	
1	t+	37,31000	****
3	D1/4	38,82800	****
2	D1/2	45,49600	****
4	D1/8	50,56800	****

(C) : Résultat du test de Newman Keuls (fleurs - témoin +)

Groupe1: 40		Groupe2: 38					
Moyenne	Moyenne	Valeur t	dl	p	N Actifs	N Actifs	Ecart-Type
40	38				40	38	40
102,5000	103,0000	-0,277350	2	0,807550	2	2	2,121320

(D) : Comparaison des effets de la colchicine et de la dilution 1/4 de l'extrait floral

## ANNEXES

---

### Annexe 5

Tableau récapitulatif des densités optiques obtenues dans le test antiprolifératif-MTT

Echantillon	Densité optique (DO)	(DO du test – DO du blanc)
Témoin négatif	1.013	0.982
Blanc	0.031	
Standard (quercétine)	1.51	0.763
blanc	0.747	
Extrait aqueux des feuilles	0.906	0.851
Blanc	0.055	
Extrait aqueux des fleurs	0.881	0.875
Blanc	0.006	

$$\bullet \text{ Taux de viabilité (\%)} = \frac{(\text{DO du test} - \text{DO de son blanc})}{(\text{DO Témoin négatif} - \text{DO de son blanc})} \times 100$$

$$\bullet \text{ Taux de mortalité (\%)} = 100 - \text{taux de viabilité}$$

## ***RESUME***

*Erica arborea* est une plante du pourtour méditerranéen très utilisée pour ces vertus thérapeutiques diverses. Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à l'évaluation des activités antimitotique et antiproliférative des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de cette plante. L'évaluation de l'effet antimitotique a été réalisée en utilisant des racines d'*Allium cepa* comme modèle expérimental. Des indices mitotiques IM (%) ont été calculés et des anomalies cellulaires, nucléaires et chromosomiques ont été recensées au niveau des cellules traitées par les différents extraits. La cytotoxicité de ces extraits vis-à-vis des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* a été évaluée par le test antiprolifératif-MTT. Ce test colorimétrique est basé sur la capacité des cellules vivantes métaboliquement actives à réduire le sel de tetrazolium en cristaux de formazan. Cette réduction est proportionnelle au pourcentage de viabilité cellulaire.

Nos résultats révèlent que les extraits aqueux des feuilles et des fleurs d'*Erica arborea* inhibent la mitose. Les plus faibles indices mitotiques sont obtenus avec la dilution 1/2 de l'extrait aqueux des feuilles et la dilution 1/4 de l'extrait floral qui sont respectivement de  $51,882 \pm 1,26$  % et  $38,828 \pm 2,84$  %. Le test de Student montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les effets de la dilution 1/4 de l'extrait aqueux des fleurs et de la colchicine. De nombreuses anomalies de la mitose ont été observées notamment des agglutinations, des cellules binucléées et des fragmentations chromosomiques. L'extrait aqueux de feuilles bloque la mitose en prophase, tandis que celui des fleurs affecte la métaphase. Les extraits aqueux testés présentent une faible activité antiproliférative sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

*Erica arborea* possède une activité antimitotique due à la présence de divers métabolites secondaires au niveau de ses feuilles et de ses fleurs.

**Mots clés:** *Erica arborea*, Extrait aqueux, fleurs, feuilles, activité antimitotique, activité antiproliférative.

## ***ABSTRACT***

*Erica arborea* is a Mediterranean plant widely used for these various therapeutic virtues. In this study, we were interested in evaluating the antimitotic and antiproliferative activities of the aqueous extracts of the leaves and flowers of this plant. Evaluation of the antimitotic effect was performed using *Allium cepa* roots as an experimental model. Mitotic indices MI (%) were calculated, cellular, nuclear and chromosomal abnormalities were recorded in the cells treated with the different extracts. The cytotoxicity of these extracts against *Saccharomyces cerevisiae* cells was evaluated by the antiproliferative-MTT test. This colorimetric test is based on the ability of metabolically active living cells to reduce tetrazolium salt to formazan crystals. This reduction is proportional to the percentage of cell viability.

Our results reveal that aqueous extracts of leaves and blossoms of *Erica arborea* inhibit mitosis. The lowest mitotic indices are obtained with the dilution 1/2 of the aqueous leaf extract and the 1/4 dilution of the floral extract which are  $51.882 \pm 1.26\%$  and  $38.828 \pm 2.84\%$  respectively. The Student's test shows that there is no significant difference between the effects of 1/4 dilution of the aqueous extract of flowers and colchicine. Numerous abnormalities of mitosis have been observed including agglutination, binucleate cells and chromosomal fragmentation. Aqueous extract of leaves blocks mitosis in prophase, while that of flowers affects metaphase. The aqueous extracts tested showed low antiproliferative activity on *Saccharomyces cerevisiae* cells.

*Erica arborea* has antimitotic activity due to the presence of various secondary metabolites in its leaves and flowers.

**Keywords:** *Erica arborea*, *Aqueous extract*, *Flowers*, *leaves*, *Antimitotic activity*, *antiproliferative activity*.

## ملخص

يعتبر الخنج الشجيري احدى الأصناف النباتية السائدة على حدود اقليم البحر الأبيض المتوسط و التي تستعمل على نطاق واسع نظرا لخصائصها الاستطبابية المختلفة. يهدف هذا العمل الى دراسة النشاطين الضد الأقسومي و السمي للمستخلصات المائية لأوراق و ازهار الخنج الشجيري. تمت دراسة و تقييم قدرة هذه المستخلصات على تثبيط الانقسام الخيطي المتساوي في الخلايا المرستيمية للقمة النامية لجذور البصل بقياس مؤشر النشاط الأقسومي (IM %). سمحت الملاحظات المجهرية بإحصاء مختلف التشوهات الخلوية، النووية و الصبغية خلال كل مراحل الانقسام. تم تقدير السمية الخلوية لهذه المستخلصات على محلول خميرة الجعة باستعمال اختبار السمية بالـ MTT و هو اختبار لوني يسمح بتقدير قدرة الخلايا الحية على ارجاع املاح التترازوليوم الى بلورات الفورمازان حيث تتناسب هذه القدرة الارجاعية طردا مع عدد الخلايا في محلول الخميرة. تشير النتائج التي تحصلنا عليها الى أن المستخلصات المائية للأوراق و الأزهار تثبط الانقسام الخيطي المتساوي. ادنى المؤشرات الأقسومية هي  $51.882 \pm 1.26$  % و  $38.828 \pm 2.84$  % بالنسبة للمستخلصين الورقي و الزهري على الترتيب. يظهر اختبار Student أن المستخلص الزهري الممدد 1/4 يمتاز بنشاط ضد أقسومي مماثل لنشاط محلول الكولشسين. تمت ملاحظة عدة اختلالات في البنية الصبغية على غرار التراص و الانشطار الصبغيين و كذلك وجود خلايا ثنائية النوى. يكمن تأثير المستخلص الورقي خاصة خلال المرحلة التمهيدية بينما يؤثر المستخلص الزهري خلال الطور الاستوائي. تمخض عن النتائج وجود نشاط سمي ضئيل للمستخلصات المائية إذ لا تعتدى نسبة الإبادة الخلوية 13.35 %.

**الكلمات الرئيسية:** الخنج الشجيري، المستخلص المائي، الاوراق، الأزهار، النشاط الضد

الأقسومي، النشاط السمي خلوي.