

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la
recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences
Agronomiques



Master de fin d'étude
En vue de l'obtention du Diplôme
De Master
En Sciences Biologiques
Option : Biochimie de la nutrition

THEME

**Effet antimitotique et cytotoxique des alcaloïdes de la fraction et des
extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L.**

Présenté par Mme Harchaoui Lyna

Membre du jury :

Présidente : Mme Iratni GH.

Encadreur : Mr Haouali K.

Co-encadreur : Mme Ouzid Y.

Examineur : Mr Sebbane H.

Maitre de conférences B à l'UMMTO.

Professeur à l'UMMTO.

Docteur à l'UMMTO.

Maitre assistant A à l'UMMTO.

Soutenu le 16/07/2019

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la
recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences
Agronomiques



Master de fin d'étude
En vue de l'obtention du Diplôme
De Master
En Sciences Biologiques
Option : Biochimie de la nutrition

THEME

**Effet antimutogène et cytotoxique des alcaloïdes de la fraction et des
extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L.**

Présenté par Mme Harchaoui Lyna

Membre du jury :

Présidente : Mme Iratni GH.

Encadreur : Mr Haouali K.

Co-encadreur : Mme Ouzid Y.

Examineur : Mr Sebbane H.

Maitre de conférences B à l'UMMTO.

Professeur à l'UMMTO.

Docteur à l'UMMTO.

Maitre assistant A à l'UMMTO.

Soutenu le 16/07/2019

Dédicaces.....	
Remerciements	
Abréviations	
Introduction	1
Première partie: Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur <i>Peganum harmala</i> L.....	2
1.1. Systématique.....	2
1.2. Répartition géographique	2
1.3. Description botanique.....	3
Chapitre II : Généralités sur les métabolites secondaires	4
2.1. Les huiles essentielles.....	4
2.2. Les glucosinolates.....	4
2.3. Les alcaloïdes	5
2.4. Les composés phénoliques	6
Chapitre III : Généralités sur le cycle cellulaire	6
3.1. Définition.....	6
3.2. Les différentes phases de la division cellulaire	7
Chapitre IV : Activité cytotoxique des alcaloïdes	11
4.1. Action sur les membranes érythrocytaires.....	11
4.1.1. Les globules rouges	11
4.1. 2. Les signes biologiques de l'hémolyse	12
4.1. 3. Exemple de substance hémolytique d'origine végétale.....	13
4.1.3.1. Les saponines.....	13
4.1.3.2. Structure des saponines	13
4.1.3.3. Les activités biologiques des saponines	14

4. 2. Actions antimitotiques.....	15
4. 2.1. Définition.....	15
4. 2.2. Quelques antimitotiques d'origine végétale	15
4. 2.2.1. La colchicine.....	15
4. 2.2.2. Les vincalcaloïdes.....	16
4. 2.2.3. Les podophyllotoxines.....	16
4. 2.2.4. Taxol.....	17
4. 2.2.5. La quercétine ou quercétol	18
4. 3. Action génotoxique.....	19
4. 3.1. Les génotoxiques	19
4. 3. 2. Types de mutations.....	19
4. 3. 2.1. Mutations géniques.....	19
4. 3.2.2. Mutations chromosomiques.....	19
4. 2.2.2. Test des aberrations chromosomiques	20
Deuxième partie: L'expérimentation	
I. matériels et méthodes	21
1.1. Matériels utilisés.....	21
1.1.1. Matériels biologiques	21
1.1.2 Matériels de laboratoire	21
1.1.3. Réactifs et solvant.....	22
1.2. Méthodes utilisées	23
1.2.1. Préparation des extraits.....	23
1.2.2. Extraction aqueuse.....	23
1.2.3. Extraction des alcaloïdes	23
1.3.Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes.....	25
1.3.1 Les Alcaloïdes	25
1.3.2. Flavonoïdes.....	26
1.4. Activités biologiques	27

1.4.1. L'activité antimototique	27
1.4.2.Evaluation de l'effet de la fraction des alcaloïdes.....	30
1.4.2.1 Préparation de la suspension d'hématies à 2%	30
1.4.2.2. Action sur la membrane érythrocytaire	30
1.5. Analyses statistiques des résultats	32
II. Résultats et discussions.....	33
2.1.Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes	33
2.1.1. Dosage des alcaloïdes.....	33
2.1.2. Dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux.....	33
2.2. Etude de l'indice mitotique et de l'indice de phase	33
2.3. Etude des aberrations et anomalies chromosomiques.....	36
2.3.1. Les aberrations chromosomiques	36
2.4. Valeurs limites de cytotoxicité	39
2.5. Evaluation de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux sur la membrane érythrocytaire.....	40
Conclusion générale	41
Références bibliographiques.....	
Annexes	

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à la personne qui m'est la plus chère au monde, elle a toujours été là pour moi pour me soutenir, m'encourager et m'aider à me relever quand j'étais faible. C'est ma sœur mon amie ma confidente et surtout mon exemple.
Merci pour tout, maman, je ne serais jamais arrivée là sans tes prières.

Remerciements

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), au sein de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, département de Biochimie Microbiologie de l'université Mouloud Mammeri, sous la direction du Professeur HOUALI KARIM, à qui j'adresse ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur HOUALI K, professeur à UMMTO, pour m'avoir proposé ce sujet.

Je remercie Madame OUZID Y, Docteur à l'UMMTO, d'avoir accepté de Co-encorder ce mémoire, et à qui j'exprime ma profonde reconnaissance pour les conseils éclairés et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

Je remercie Madame IRATNI G maitres de conférences classe B pour avoir accepté de présider ce Jury, et pour son aide précieuse.

Il m'est agréable d'exprimer mes vifs remerciements à Monsieur SEBBANE B, maitre-assistant A à l'UMMTO, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce mémoire et de participer au jury.

Ce mémoire m'a donné la chance de travailler avec des personnes absolument remarquables qui ont contribué à animer une joyeuse atmosphère au quotidien.

J'envoie en suite mes plus sincères remerciements à mes adorables parents et à mon cher mari Bilal pour leurs encouragements et leur soutien.

LISTE DES ABREVIATIONS

A. cepa : *Allium cepa* .

AC: absence de cytotélière.

AG : agglutination chromosomique.

AL: allongement des cellules.

CA: corps apostoliques.

CB: cellules binuclées.

CG: cellules gigantesque.

CH₃OH : Méthanol.

CHCl₃: Chloroforme.

CS: cellules sans noyau.

DO : densité Optique.

DO_F : densité de la fraction d'alcaloïdes.

DO_I : densité de l'extrait aqueux.

DP: désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase.

EQ : extrait aqueux.

ES : erreur standard.

F : fraction d'alcaloïdes.

FR: fragmentation chromosomique.

IA : indice d'aberration.

IM : indices mitotique.

IP : indice de phases.

PC: pont chromosomique.

V/V: Rapport volume par volume.

INTRODUCTION

Depuis les temps anciens, les plantes sont utilisées par l'Homme pour différents besoins notamment la nourriture et les soins de santé. De nos jours, la nature fournit toujours une source plus fiable d'agents médicaux. Presque 40 % de médicaments actuellement disponibles sont des dérivés directs ou indirects des précurseurs naturels issus des plantes (SOHAIL *et al.*, 2011). En Afrique, les populations dépendent encore largement des plantes médicinales pour guérir les maladies. L'utilisation des remèdes à base de plantes et d'autres matériaux est une partie intégrante de la culture africaine.

Environ 2 à 4 % d'espèces végétales contiennent une grande quantité de constituants antinéoplasiques et/ou cytotoxiques. Les composés isolés à partir de ces espèces conduisent aux développements de nouveaux produits puissants qui inhibent le développement des tumeurs (FASLA, 2009)

Peganum harmala L., de nom local harmel, est un remède populaire. Les graines sont utilisées comme antispasmodiques en Afrique du Nord (BELLAKHDAR, 1997) et au moyen orient (SIDDIQUI *et al.*, 1987). *Peganum harmala* L. est très réputée pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes (de type β -carbolinique), ce qui la classe parmi les plantes hallucinogènes à effets psychotropes (DUKE, 1929; FARNSWORTH, 1968). Elle possède également des propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-virales, anti-oxydantes, anti-diabétiques, anti-tumorales, anti-leishmanioses, effet insecticide, une activité cytotoxique, ainsi que des effets hépato-protecteurs (JINOUS *et FERESHTEH*, 2012). Cependant mal utilisée elle peut être très toxique pour les animaux et l'homme en particulier. Elle est responsable de la paralysie du système nerveux et entraîne la mort par arrêt respiratoire chez les vertébrés, et peut provoquer l'interruption de grossesse chez les femmes (BELLAKHDAR, 1997). Elle est également abortive et anti-fertilisante chez les rats (NATH *et al.*, 1993).

Afin de contribuer à la valorisation des plantes médicinales locales réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous nous sommes intéressés dans le présent travail, à l'étude de l'activité antimotile et hémolytique d'extraits aqueux et de la fraction des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L., récolté à Timzerth. Dayate Aiat dans la wilaya de Laghouat au sud algérien.

PREMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur *Peganum harmala* L.

Peganum harmala L. est une espèce vivace de la famille des Zygophyllaceae. Cette dernière est connue depuis le Tertiaire (entre 65 et 2.5 millions d'années). La famille des Zygophyllaceae comprends environ 30 genres et 250 espèces xérophytes et halophytes, habitant les régions arides et semi-arides du globe (EMBERGER, 1960).

1.1. Systématique

Selon la classification phylogénétique (APG II, 2003) *Peganum harmala* L. appartient aux taxa suivants :

Embranchement : Spermaphytæ

Sous-embranchement : Angiospermae

Division: Rosidées

Classe : Fabidées

Ordre : Aucun

Famille: Zygophyllaceae

Genre : *Peganum*

Espèce: *harmala* L.

1.2. Répartition géographique

C'est une plante endémique des zones arides et semi- arides, *P.harmala* L., est une plante cosmopolite très commune dans les sols sableux et un peu nitrés (OZENDA, 1958), elle se développe en :

-Afrique: particulièrement dans les zones arides méditerranéennes (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts-plateaux algériens, Tunisie, steppes de la Libye et déserts d'Egypte);

-Algérie, *Peganum harmala* L. est commune aux hauts plateaux, au Sahara septentrional et méridional, et aux montagnes du Sahara central. Il est réputé pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (MAIRE, 1933; CHOPRA *et al.* 1960 et OZENDA, 1991).

-Europe: dans les zones sèches (Espagne, steppes de la Russie méridionale et Hongrie);

-Asie: dans les steppes de l'Iran et de l'Irak, du Pakistan, du Turkestan jusqu'au Tibet et en Sibérie (PARIS et DILLEMANN, 1960; BEZANGER-BEAUQUESNE *et al.*, 1980).

1.3. Description botanique

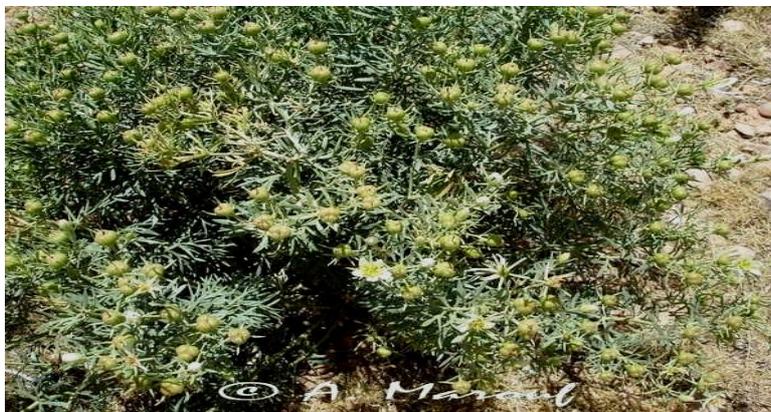
Le Harmel est une plante herbacée, vivace, glabre (OZENDA, 1958), buissonnante de 30 à 90 cm de hauteur à rhizome épais, à odeur forte, désagréable qui rappelle celle de la rue (HAMMICHE et MERAD, 1990) (Figure 1.a). Les tiges dressées, très rameuses portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites (HAMMICHE et MERAD, 1990). Les fleurs de couleur blanc-jaunâtre (OZENDA, 1958) sont assez grandes de 25 à 30 mm (QUEZEL et SANTA, 1963). Elles sont formées de:

- cinq sépales verts, linéaires, persistants qui dépassent la corolle ;
- cinq pétales elliptiques ;
- dix à quinze étamines à filet très élargi dans leur partie inférieure (OZENDA, 1958)

(Figure 1.b).

L'ovaire, globuleux, repose sur un disque charnu et aboutit à un fruit qui est une capsule sphérique, à trois loges, de 6 à 8 mm déprimée au sommet, entourée des sépales persistants et s'ouvrant par 3 ou 4 valves pour libérer les graines (QUEZEL et SANTA, 1963).

Les graines sont nombreuses, petites, anguleuses, subtriangulaires, de couleur marron foncée, dont le tégument externe est réticulé. Elles ont une saveur amère et sont récoltées en été (CHOPRA *et al.*, 1960) (Figure 1.c).



a : Arbuste



b : Fleur



c : Fruit

Figure 1 : Morphologie de *Peganum harmala* L. (www.motherherbs.com/peganum-harmala.html)

Chapitre II : Généralités sur les métabolites secondaires

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires des plantes sont des produits chimiques non nutritifs qui ont des propriétés préventives ou protectrices des maladies (KARTHISHWARAN et *al.*, 2010). Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes phytochimiques, source de molécules biologiquement actives.

2.1. Les huiles essentielles

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs des cellules génératrices de métabolites secondaires où des molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène). L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique. Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques telles qu'antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

2.2. Les glucosinolates

Les glucosinolates sont constitués d'un résidu β -D-glucose, d'un résidu oxime sulfaté et d'une chaîne latérale de structure variable selon l'acide aminé dont elle dérive. Leur hydrolyse, au cours de la mastication ou de la préparation culinaire, aboutit à la formation d'isothiocyanates dont la formule générale . Les glucosinolates sont notamment rencontrés dans les Brassicaceae ou Crucifères (chou, navet, brocoli, radis, moutarde) et présents à des teneurs variables.

Les glucosinolates sont stockés dans toutes les parties de la plante et libérés lors d'une attaque de phytophages. Dans l'alimentation, les glucosinolates à forte dose sont toxiques et antinutritifs mais à faibles doses, leurs produits de dégradation ont des propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-oxydantes, antimutagéniques et anticarcinogéniques.

2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Ils provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques, à forte dose sont très toxiques. Ce sont des composés azotés naturels et dont le goût est amer. Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole. Les alcaloïdes issus du métabolisme des acides aminés sont des alcaloïdes vrais. Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Ils sont caractérisés par des propriétés basiques dues à la présence d'un atome d'azote hétérocyclique (GUIGNARD *et al.*, 1985). Il peut être extracyclique mais le plus fréquemment intracyclique (GUIGNARD *et al.*, 1985). Ils sont formés principalement à partir de divers acides aminés (phénylalanine, tryptophane, ornithine, méthionine) intervenant dans le processus de transméthylation (HERBERT, 1988). En plus des acides aminés, interviennent des unités acétate ou terpénique (PARIS et HURABIELLE, 1981).

Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain. Les pyrrolizidines et les tropanes sont les plus importants. Les pyrrolizidines, très répandues dans la nature, sont présents dans les plantes qui font partie des familles botaniques *Asteracea*, *Boraginaceae*, *Fabaceae* et *Orchidaceae*.

Comme alcaloïdes naturelles on peut citer la cocaïne qui est un alcaloïde peu abondant présent dans les *Erythroxylum*, la lobéline, extraite de la *Lobelia inflata*, la spartéine, isolée de *Cytisus scoparius*, l'éphédrine, isolée d'*Ephedra sinica*, la papavérine, isolée de *Papaver somniferum*, la morphine, isolée de la plante de la famille des opiacées et la galanthamine isolé des *Amaryllidaceae*.

Quand à *P. harmala* L. des alcaloïdes de type β -carbolines: harmine ($C_{13}H_{12}N_2O$), harmaline ($C_{13}H_{14}N_2O$), harmalol (= harmol) ($C_{12}H_{12}N_2O$) et harmane ($C_{12}H_{10}N_2$); et les dérivés quinazolines: vasicine (péganine) ($C_{13}H_{15}ON_2$) et vasicinone ($C_{11}H_{10}O_2N_2$) (KAMEL *et al.*, 1970), ont été isolés. Les alcaloïdes du Harmel possèdent diverses activités biologiques : analgésiques, diurétiques, anthelminthiques, antiprolifératives, abortives, antimicrobiennes (TAHROUCH *et al.*, 2002), antispasmodiques, antipyrétiques (CHOPRA *et al.*, 1958) et hallucinogènes (O'HEARN et MOLLIVER, 1993).

2.4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un des groupes les plus importants chez les végétaux, issus de la grande voie d'aromagenèse ; shikimates ou acide shikimique et de la voie acétate-malonate et peuvent être divisés en diverses classes sur la base de leur structure moléculaire, et plus de 8000 composés différents ont été décrits. Les plus abondants sont les acides phénols, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes, dont les flavonoïdes et les acides phénols comptent 60% et 30%, respectivement, de polyphénols diététiques. Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées, et partagent un squelette carboné commun de diphenylpropanes (C₆-C₃-C₆ ; c.-à-d., deux noyaux benzènes jointifs par une chaîne linéaire de troiscarbones formant un hétérocycle oxygéné) . Les flavonoïdes peuvent être divisés en diverses classes selon leur structure moléculaire ; les groupes principaux sont les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones et les anthocyanidines.

Les Flavonoïdes identifiés chez *Peganum harmala* L. sont des coumarines, tanins, stérols-triterpènes (AL YAHYA, 1986).

Chapitre III : Généralités sur le cycle cellulaire

Découverte il y a plus de 150 ans, la division cellulaire a fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental pour toute vie (MEIJER, 2003). Les chercheurs s'attachèrent à en modifier ce mécanisme complexe et délicat en faisant agir sur des cellules en croissance des agents chimiques ou physiques (DUSTIN, 1956).

Les travaux de Dustin et ses collaborateurs sur la colchicine en 1934 ont contribué à un développement considérable des recherches sur les poisons mitotiques.

Aujourd'hui, la recherche de produits anti-mitotiques à des fins thérapeutiques s'appuie sur l'utilisation directe de régulateurs du cycle cellulaire comme cibles (POMMIER et KOHN, 2003).

3.1. Définition

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation, par division de la cellule mère, et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles grâce à la mitose. Le cycle cellulaire comprend (MAILLET, 2002):

- l'interphase ;
- la phase M ou mitose au cours de laquelle la cellule se divise pour donner naissance à deux cellules filles strictement semblables.

3.2. Les différentes phases de la division cellulaire

- **L'interphase** : l'interphase correspond, en général, à la plus grande partie du cycle, elle se décompose en une phase G₁, une phase S et une phase G₂ (MAILLET, 2002) (Figure 2).
- **La phase G₁** (G = gap): correspond à l'intervalle qui sépare la fin de la mitose et le début de la synthèse de l'ADN. Au cours de cette étape, la cellule synthétise des molécules d'ARN (ARNm, ARNr, ARNt) et assure la production des protéines nécessaires à l'accroissement de la cellule.
- **La phase S** (S= synthèse) : correspond à la réplication de l'ADN.
- **La phase G₂** : cette phase prépare la mitose, elle est caractérisée par la synthèse des protéines motrice de la condensation des chromosomes.

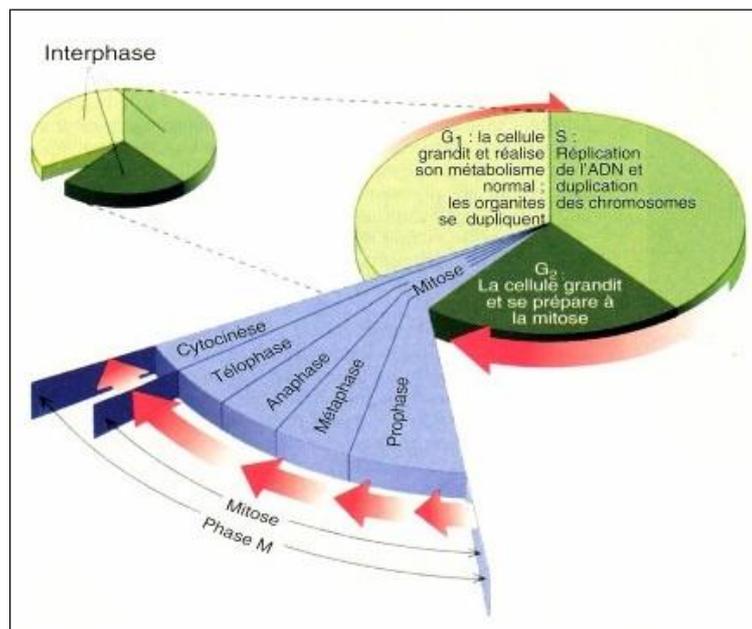


Figure 2 : Différentes phases du cycle cellulaire (KARP, 1998).

- **La phase M ou mitose** (du Grec *mi* : en deux ; *tom* : coupure) :

Le processus de division cellulaire comprend, une division nucléaire (**caryocinèse**); une division cytoplasmique (**cytodiérèse**).

La caryocinèse comprend cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télaphase. Elle est produite grâce au fuseau mitotique constitué de microtubules (ALBERTS *et al.*, 1997) (Figure 3).

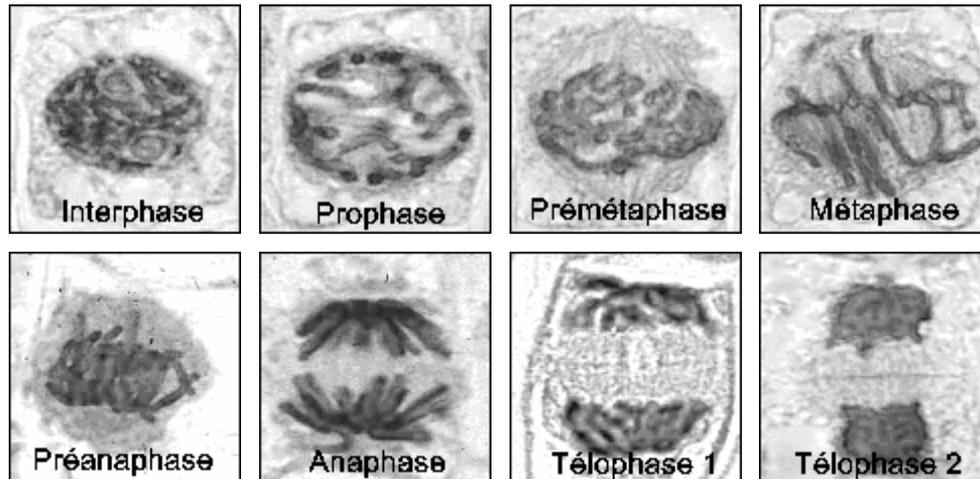


Figure 3 : Différentes phases de la division cellulaire ([http:// www.Webencyclo.fr/home.Asp](http://www.Webencyclo.fr/home.Asp)).

Le microtubule est par nature instable. Ainsi, en présence de protéine kinase, sa taille s'accroît (polymérisation GTP dépendante) ; en présence de phosphatase, elle décroît (dépolymérisation par phosphorylation). Le passage de la polymérisation à la dépolymérisation ou l'inverse correspond à ce qu'on appelle « instabilité dynamique ».

Cette instabilité est essentielle à (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001):

- l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique ;
- leur alignement en métaphase ;
- la séparation des chromatides durant la mitose.

Les microtubules interviennent dans de nombreux processus cellulaires (ALBERTS *et al.*, 1997):

- mouvements (cils et flagelles) ;
- transport intracellulaire d'organelles ;
- organisation du fuseau mitotique (centrosomes, microtubules du fuseau et du kinétochore).

• **La prophase** correspond à :

- la division du centre organisateur des microtubules (MTOC) ;
- la condensation des chromosomes ;

- la rupture de l'enveloppe nucléaire ;
- le début de formation du fuseau à l'extérieur du noyau.

• **La prométaphase** se caractérise par :

- la rupture complète de l'enveloppe nucléaire ;
- la formation du fuseau achromatique ;
- le début d'alignement des chromosomes.

• **La métaphase** est caractérisée par le rassemblement de tous les chromosomes sur la plaque équatoriale. Le fuseau est alors constitué par un ensemble de microtubules (KARP, 1998):

- **les microtubules de l'aster** : interviennent dans la mise en place du fuseau : ils rayonnent à partir de chaque centrosome et déterminent le plan de la cytotéière ;
- **les microtubules polaires** : partent d'un centrosome et dépassent les chromosomes. Ils maintiennent l'intégrité du fuseau. Ils n'atteignent pas l'autre pôle de la cellule, mais ils s'intercalent avec ceux qui viennent du pôle opposé. Leurs extrémités, qui se chevauchent, sont unies par des protéines motrices ;
- **les microtubules kinétochoriens** : caractérisés par la présence des kinétochores (complexes multiprotéiques assurant la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules), qui attachent les chromosomes aux microtubules, les dirigent vers le plan équatorial de la cellule (Figure 4).

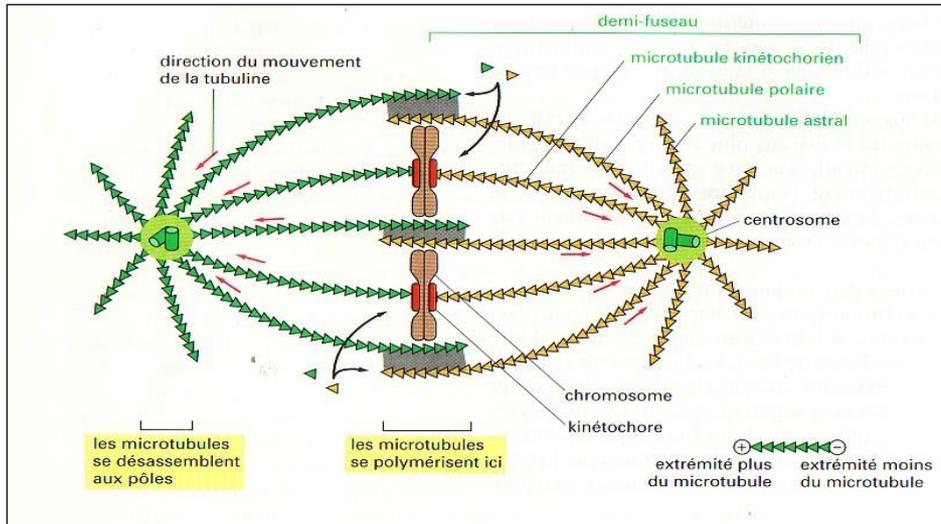


Figure 4 : Représentation schématique du fuseau mitotique en métaphase (ALBERTS et *al.*, 1997).

• **L'anaphase** correspond au partage des chromosomes en deux lots identiques, elle est caractérisée par :

- l'allongement des microtubules polaires ;
- le raccourcissement des microtubules kinétochoriens ;
- la migration des chromosomes vers les pôles mitotiques.

• **La télophase** est une période caractérisée par :

- l'arrêt de migration des chromosomes vers les pôles ;
- la disparition du fuseau ;
- la décondensation des chromosomes ;
- la reconstitution de l'enveloppe nucléaire à partir du réticulum endoplasmique
- le début de la cytotélorèse.

• **La cytotélorèse :**

La cytotélorèse commence après la télophase ou un peu avant sa fin. La cellule se contracte entre les deux jeunes noyaux jusqu'à couper le cytoplasme et à séparer les deux cellules filles. La cytotélorèse est produite grâce à un anneau contractile constitué de filaments d'actine chez la cellule animale, ou grâce à la plaque cellulaire (phragmoplaste) chez la cellule végétale (MABUCHI, 1986).

Chapitre IV : Activité cytotoxique des alcaloïdes

4.1. Action sur les membranes érythrocytaires

4.1.1. Les globules rouges

Les érythrocytes sont des cellules matures ayant une forme biconcave avec un diamètre variant de 6.8 à 7.5 μm . La durée de vie moyenne des hématies est de 120 jours. La forme discoïde des globules rouges favorise l'ancrage du cytosquelette, l'organisation des lipides et les échanges avec le milieu externe. Dans ce type de cellules simplifiées (anucléée) la membrane est le seul composant structural, mais malgré cela son interaction avec le cytosquelette est complexe (MOHANDAS et GALLAGHER, 2008).

La membrane plasmique des globules rouges est composée principalement (en poids) de 52% de protéines, 40% de lipides et 8% de glucides. Les lipides membranaires comportent : les phospholipides (63%), les cholestérols non estérifiés (25%) et les glycosphingolipides qui forment une double couche où les groupements polaires sont orientés vers l'extérieur tandis que les groupements apolaires sont orientés vers l'intérieur, (DODGE et *al.*, 1963) (Figure 5). La cohésion des lipides et des protéines est due à des interactions non covalentes telles que les interactions des Van Der Waals, les liaisons hydrogène, les forces électrostatiques et les liaisons hydrophobes, (DODGE et *al.*, 1963). La membrane érythrocytaire contient aussi des protéines membranaires qui jouent des rôles importants dans les échanges avec le milieu extérieur tel que les pompes d'ATPase Na^+ / K^+ et Ca^{2+} , les protéines de transport des anions, de l'eau et du glucose. Elles jouent aussi un rôle dans la stabilité et l'ancrage des hématies avec le cytosquelette cellulaire grâce à : la protéine bande 3, la Glycophorine A et la Glycophorine C qui forment des interactions avec les protéines intrinsèques, (ELGSAETER et *al.*, 1986).

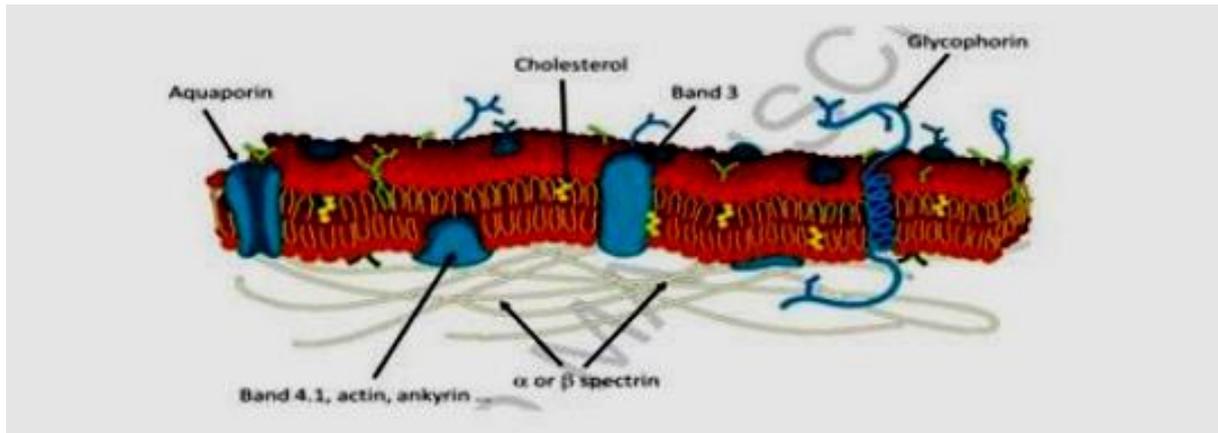


Figure 5 : Structure de la membrane de globules rouges (MANAARGADOO-CATIN *et al.*, 2016).

4.1.2. Les signes biologiques de l'hémolyse

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal, (THOMAS, 2013). Cependant, dans certains cas l'hémolyse est exagérée, réduisant la durée de vie des hématies on parle alors d'une hyper hémolyse, (UCAR, 2002).

Généralement, l'hémolyse provoque une augmentation du taux d'hémoglobine, de la lactate déshydrogénase (LDH) et une diminution du taux d'haptoglobine et de l'hémoglobine glycosylé. L'hémoglobine libérée est dégradée en bilirubine, non conjuguée représentant 80% de la bilirubine totale, ou bien forme un complexe avec l'haptoglobine. Ce complexe est éliminé rapidement par le foie, ce qui entraîne des niveaux d'haptoglobine faibles (MARCHAND *et al.*, 1980). L'hémolyse est définie par une couleur rose-rouge détectable lorsque les taux plasmatiques d'hémoglobine dépassent la capacité de liaison à l'haptoglobine (0,3 g/L) et provoque une augmentation de fer dans les urines, (WILTINK *et al.*, 1972). Cette hémolyse est la cause de pathophysiologies spécifiques telles que les maladies vasculaires aiguës et chroniques, l'inflammation, la thrombose et l'insuffisance rénale. Elle joue un rôle important dans la translocation de l'hémoglobine dans l'espace extravasculaire, les réactions oxydatives, la libération de l'hémine dans la signalisation moléculaire, (SCHAER *et al.*, 2013).

4.1.3. Exemple de substance hémolytique d'origine végétale

4.1.3.1. Les saponines

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (VINCKEN *et al.*, 2007 *in* MANASE, 2014) : par exemple le frondoside A isolé de *Cucumaria frondosa*, l'eximisoside A isolé de *Psolus eximius*, les thyonosides A et B isolés de *Thyone aurea*, et le neothyonidioside isolé de *Stichopus mollis* (GIRARD *et al.*, 1990 ; KALININ *et al.*, 1997 ; BONNARD et RINEHART, 2004 ; MORAES *et al.*, 2004 *in* MANASE, 2014). Le nom «saponine» est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante.

Comme les flavonoïdes et les alcaloïdes, les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. Ce sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes.

4.1.3.2. Structure des saponines.

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique (Figure 6) et saponine triterpénique (Figure 7). Hostettman et Marston, 1995, attribuent aux hétérosides d'amines stéroïdiques (solasolènes et solanidanes) le rang de troisième groupe dans la famille des saponines. Cependant d'autres auteurs distinguent ce groupe comme des alcaloïdes. Certes, ce ne sont biogénétiquement que des pseudo-alcaloïdes et, en termes de propriétés, leur comportement n'est pas sans rappeler celui des saponosides. Il n'en demeure pas moins que l'origine de leur atome d'azote les rapproche d'autres dérivés azotés du métabolisme terpénique que l'on s'accorde à considérer comme des alcaloïdes (ex. : aconitine) (BRUNETON, 2009 *in* MANASE, 2014).

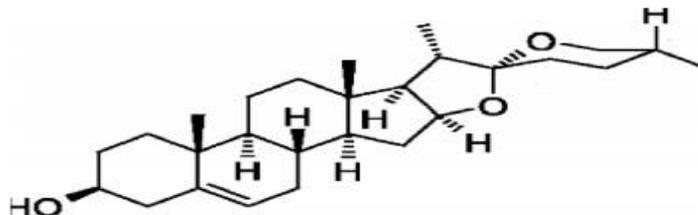


Figure 6: structure générale des saponines stéroïdique (GARAI, 2014).

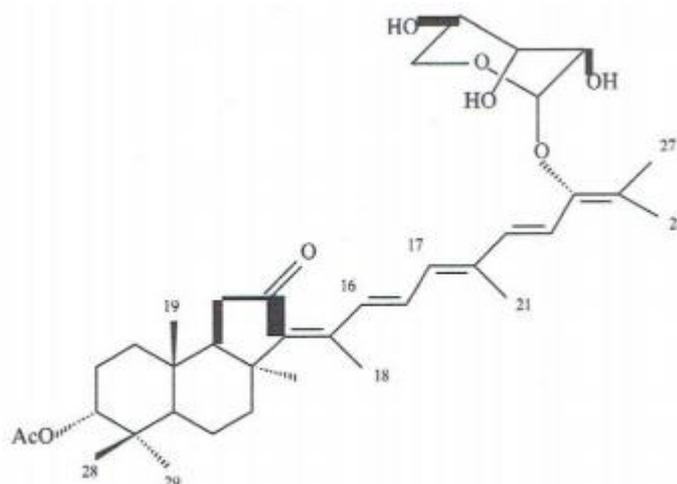


Figure 7 : structure générale des saponines triterpénique (GARAI, 2014).

4.1.3.3. Les activités biologiques des saponines.

Les saponines présentent des activités biologiques et pharmacologiques variées, principalement dans les domaines de l'immunologie, la cancérologie et la microbiologie (LACAILLE-DUBOIS et WAGNER, 2000 ; LACAILLE-DUBOIS, 2005a,b, 2013 ; LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2013).

Les saponines sont connues pour leurs activités anti-tumorales (LACAILLE-DUBOIS, 2005c ; SAUTOUR *et al.*, 2007b ; PODOLAK *et al.*, 2010), anti-inflammatoires (ADÃO *et al.*, 2011, immunostimulants et immunoadjuvants (LACAILLE-DUBOIS, 1999), molluscicides (LEMMICH *et al.*, 1995 ; CHEN *et al.*, 2012 ; DIAB *et al.*, 2012), anti-microbiennes (VERMEERSCH *et al.*, 2009), pour n'en citer que quelques-unes.

Ces activités biologiques s'expliquent par leurs caractéristiques physicochimiques, et notamment par leurs structures. En effet, les travaux de WANG *et al.*, 2007 indiquent que l'hémolyse et la cytotoxicité des saponines stéroïdes sont dépendantes de leurs structures, en particulier de la nature, du nombre et la séquence des sucres dans les saponines.

4. 2. Actions antimitotiques

4. 2.1. Définition

Les agents antimitotiques sont soit des substances, soit des radiations capables d'inhiber ou de modifier le déroulement de la mitose (MAILLET, 1977; 2002).

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

4. 2.2. Quelques antimitotiques d'origine végétale

4. 2.2.1. La colchicine

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines charnues du colchique *colchicum autumnale* L. (Liliaceae), qui en se fixant sur une molécule de la tubuline empêche sa polymérisation en microtubules (Figure 8).

L'absence ou l'insuffisance des microtubules entraîne le blocage de la division cellulaire au stade métaphase ; l'inhibition de la motilité cellulaire et le transport intracellulaire des vésicules et des organites (GARRETT ET GRISHAM, 2000).

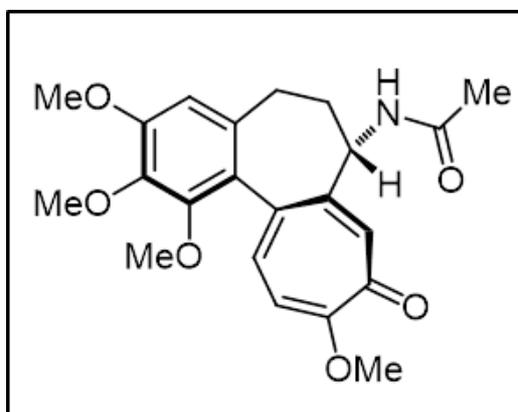


Figure 8: structure chimique de la colchicine
(<http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Colchicine>)

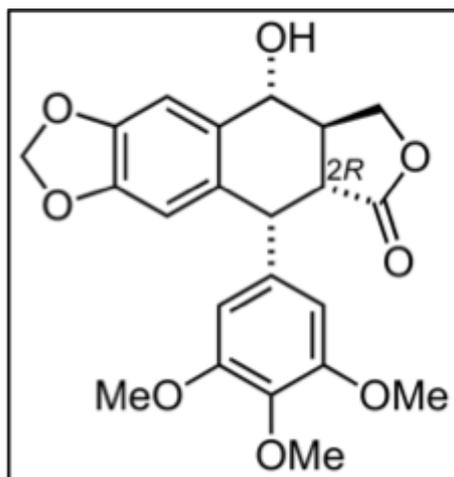


Figure 10 : Structure chimique des podophyllotoxines
 (<http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Podophyllotoxine>)

4.2.2.4. Taxol

Le taxol est extrait du *Taxus baccata* L. (if du pacifique) ou du *Taxus brevifolia* Nutt. (if nain) qui appartiennent à la famille des Taxaceae (HARTWELL, 1982). Son extraction se fait avec un rendement très faible : pour 1 kg on obtient 150 mg du taxol (MAUSSANG, 2005).

Parmi les dérivés du taxol on distingue les taxoïdes (ou taxanes) qui correspondent aux docétaxel et paclitaxel. Ces composés sont des diterpènes générés par hémisynthèse à partir de précurseurs contenus dans les feuilles d'if (EPSIE *et al.*, 1998).

Le taxotère est aussi un dérivé du taxol dont l'activité est 2,7 fois importante que le docétaxel et le paclitaxel (MAUSSANG, 2005).

Les taxoïdes facilitent la polymérisation de la tubuline à laquelle ils se lient spécifiquement et réversiblement, inhibant ainsi la dépolymérisation des microtubules. Ils empêchent donc la formation (et disparition) du fuseau mitotique (EPSIE *et al.*, 1998).

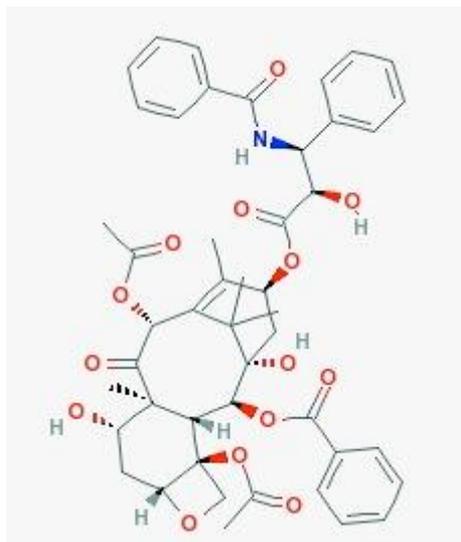


Figure 11 : Structure chimique du taxol

(<https://www.scbt.com/scbt/fr/product/taxol-33069-62-4>)

4. 2.2.5. La quercétine ou quercétol

C'est un flavonoïde de type flavonol présent chez les plantes comme métabolite secondaire (Figure 12). Le quercétol est le plus actif des flavonoïdes et de nombreuses plantes médicinales doivent leur efficacité à leur fort taux en quercétol.

La quercétine, un flavonoïde responsable de l'inhibition de la CDK (Les **CDKs** sont enzymes qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles (= substrats) jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire : fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN ..., ou dans l'avancement du cycle) et l'inhibition de la transition G0-G1 et bloque la progression du cycle cellulaire (GORDON *et al.*, 2005).

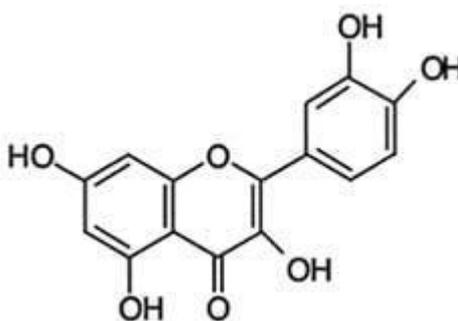


Figure 12 : Structure chimique de la quercétine (<https://www.santescience.fr/quercetine/>)

4. 3. Action génotoxique

4. 3.1. Les génotoxiques

Les génotoxiques sont des molécules qui présentent un effet toxique sur le génome, en particulier une capacité d'altérer le matériel génétique. Ces altérations peuvent être soit directes en induisant une modification de l'ADN (mutations géniques) ou des chromosomes (mutations chromosomiques), soit indirectes comme la modification de la structure des nucléotides avant incorporation dans l'ADN ou l'inhibition des enzymes de synthèse ou de réparation (ADN polymérase, ligases, topoisomérases, etc.) (mutations génomiques) (FAVELIER, 1995).

4. 3. 2. Types de mutations

4. 3. 2.1. Mutations géniques

Dans les mutations géniques on distingue :

- **les additions** ou **délétions de bases** sont souvent appelées mutations de déphasage (frameshift mutations) (LEONARD, 1990).
- **les substitutions** : sont de deux types, les transitions et les transversions. Les transitions sont dues au remplacement d'une base purique par une autre base purique, ou au remplacement d'une base pyrimidique par une autre. Les transversions consistent dans le remplacement d'une purique par une pyrimidique, ou inversement (BOTTA, 2005).

4. 3.2.2. Mutations chromosomiques

Les anomalies chromosomiques se subdivisent en anomalies de nombre (effets aneugènes) et en anomalies de structure (effets clastogènes).

Les aberrations chromosomiques peuvent être chromatidiennes (échanges, cassures,..) ou chromosomiques (affectant les deux chromatides du chromosome: fragments acentriques, dicentriques, translocations,..).

➤ Anomalies de nombre ou aneugénèse

L'aneugénèse est définie comme la modification quantitative de la garniture chromosomique et notamment la perte d'un ou de plusieurs chromosomes au cours de la mitose avec comme conséquence la perte d'une partie importante de l'information génétique des cellules descendantes concernées (BOTTA, 2005).

Les anomalies de nombre résultent, essentiellement, d'une interférence du mutagène avec l'appareil fusorial mitotique ou méiotique (microtubules). Cette interférence consiste le plus souvent en une inhibition de la polymérisation des microtubules (LEONARD, 1990).

➤ **Anomalie de structure ou clastogénéité**

Les anomalies de structure concernent l'ensemble des modifications qualitatives des chromosomes, de la structure des chromosomes; elles surviennent à la suite d'une exposition à un agent clastogène (LEONARD, 1990).

La clastogénéité peut être décelable par examen microscopique : cassures de chromosomes, avec ou sans délétions (morceaux manquants), modification de structure et d'appariement, erreurs survenues au cours de la mitose (échanges entre chromatides sœurs, etc.) (BOUNIAS, 1999).

4. 2.2.2. Test des aberrations chromosomiques

Ce test se base sur la mise en évidence des différentes aberrations chromosomiques (gap) vide, anneau (ring), délétion/fragmentation (BOURAOUI *et al.*, 2011) polyploïdie ou encore pulvérisation, induites au niveau des cellules de la moelle osseuse des souris (rongeurs), par un agent mutagène. Ces aberrations sont détectables, sous microscope optique à la 1^{re} division en bloquant les cellules en métaphase avec la colchicine (inhibiteur de fuseau) (SIERRA et GAIVÃO, 2014). L'utilité clinique de moutardes azotées est affecté par leurs effets secondaires incluant le cancer secondaire (EDER *et al.*, 1990). C'est pourquoi la recherche scientifique s'est orientée vers la recherche des molécules actives, à effet thérapeutique à partir des plantes.

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), au sein de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, département de Biochimie Microbiologie de l'université Mouloud Mammeri.

L'objectif de cette étude est de tester l'effet de la fraction d'alcaloïde et de l'extrait aqueux des feuilles de *Peganum harmala* sur la division cellulaire des cellules méristématiques d'*Allium cepa* et sur l'intégrité membranaire et érythrocytaire.

1.1. Matériels utilisés

1.1.1. Matériels biologiques

Le matériel biologique est constitué :

-des feuilles de *Peganum harmala*, qui ont été récoltées dans la région Timzerth. Dayate Aiat a Laghouat. Les feuilles de cette plante ont été lavées, puis séchées et broyées en poudre fine. Le produit final est maintenu à température ambiante pour des étatisations ultérieures ;

-des cellules méristématiques des apex racinaires d'*Allium cepa* L. qui sont utilisées comme modèle expérimental pour étudier l'activité antimitotique d'extrait aqueux et de la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala*. *Allium cepa* est considérée comme une espèce favorable pour évaluer la mitose ainsi que les anomalies chromosomiques et perturbations dans le cycle mitotique ;

-les globules rouges pour tester l'activité cytotoxique sur la membrane érythrocytaire. Un prélèvement sanguin a été effectué sur un sujet sain et conservé dans un tube héparine afin d'éviter sa coagulation.

1.1.2. Matériels de laboratoire

En plus du matériel conventionnel de laboratoire nous avons utilisé entre autre :

- l'évaporateur rotatif pour éliminer les solvants ;
- le microscope optique pour visualiser les cellules méristématiques d'oignon ;
- un lyophilisateur qui a permis d'avoir nos extraits aqueux ;
- un bain marie, une centrifugeuse, et un spectrophotomètre utilisé pour les dosages ;
- ampoules à décanter qui nous a permis d'obtenir les fractions d'alcaloïdes.

1.1.3. Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants utilisés lors de l'étude de l'activité antimittotique et cytotoxique des alcaloïdes et d'extrait aqueux sont cités dans le tableau I.

Tableau I : Les réactifs et solvants utilisés.

Composés	Concentration	rôle	Activité
Carmin acétique	/	solution de coloration	- Antimitotique -l'intégrité membranaire et érythrocytaire.
Ethanol+acide acétique	v/v: 1/3(Alcool/A.acétique)	solution de fixation	
Eau distillée	/	témoin négatif	
Colchicine	1mg/ml	témoin positif	
Quercétine	1mg/ml	/	
Carbonate de sodium	5%	basification	
Saponine	1mg/ml	agent hémolytique	
Acide chlorhydrique	32%	acidification	Dosage des alcaloïdes et flavonoïdes
Chlorure ferrique	5%	catalyseur	
Chlorure d'aluminium	2%	diluant	
Eau physiologique	9%	maintien l'équilibre osmotique	
L'éther de pétrole	Pur	Extraction	Solvants
Méthanol	99.7%		
Chloroforme.	Pur		

1.2. Méthodes utilisées

1.2.1. Préparation des extraits

Les plantes sont d'abord débarrassées de toutes impuretés (terre, parties mortes, plantes parasites, etc.), séchées puis broyées. 10 g de la poudre végétale de feuilles de *Peganum harmala* est mise dans un Erlen contenant 100 ml d'eau distillée et mise à macérer pendant 24h puis nous l'avons filtré. Le filtrat récupéré a été centrifugé à 2500 tours pendant 10 min afin de récupérer le surnageant qui constitue l'extrait aqueux.

1.2.2. Extraction aqueuse

La figure 12 présente la méthode suivie pour l'obtention du lyophilisat de poudre des feuilles de *Peganum harmala* L. Deux concentrations différentes, 4mg/ml et 10mg/ml, solubilisées dans l'eau ont été préparées.



Figure 12 : Préparation de l'extrait aqueux à partir de feuilles de *Peganum harmala* L.

1.2.3. Extraction des alcaloïdes

Pour extraire les alcaloïdes totaux, nous avons utilisé la méthode conventionnelle de HARBONE (1998). Une quantité de la poudre des feuilles de *Peganum harmala* a été extraite par du méthanol pendant 24h. Le résidu a été évaporé à sec à 60°C puis repris par du chloroforme et acidifié par du HCl à 5% à pH=3. La phase aqueuse acide a été extraite par du chloroforme et basifiée par du Na₂CO₃ à 5% à pH=9. La phase chloroformique est ensuite évaporée. Le résidu sec qui représente les alcaloïdes totaux est repris par du chloroforme.

La figure 13 résume les principales étapes d'extraction des alcaloïdes totaux.

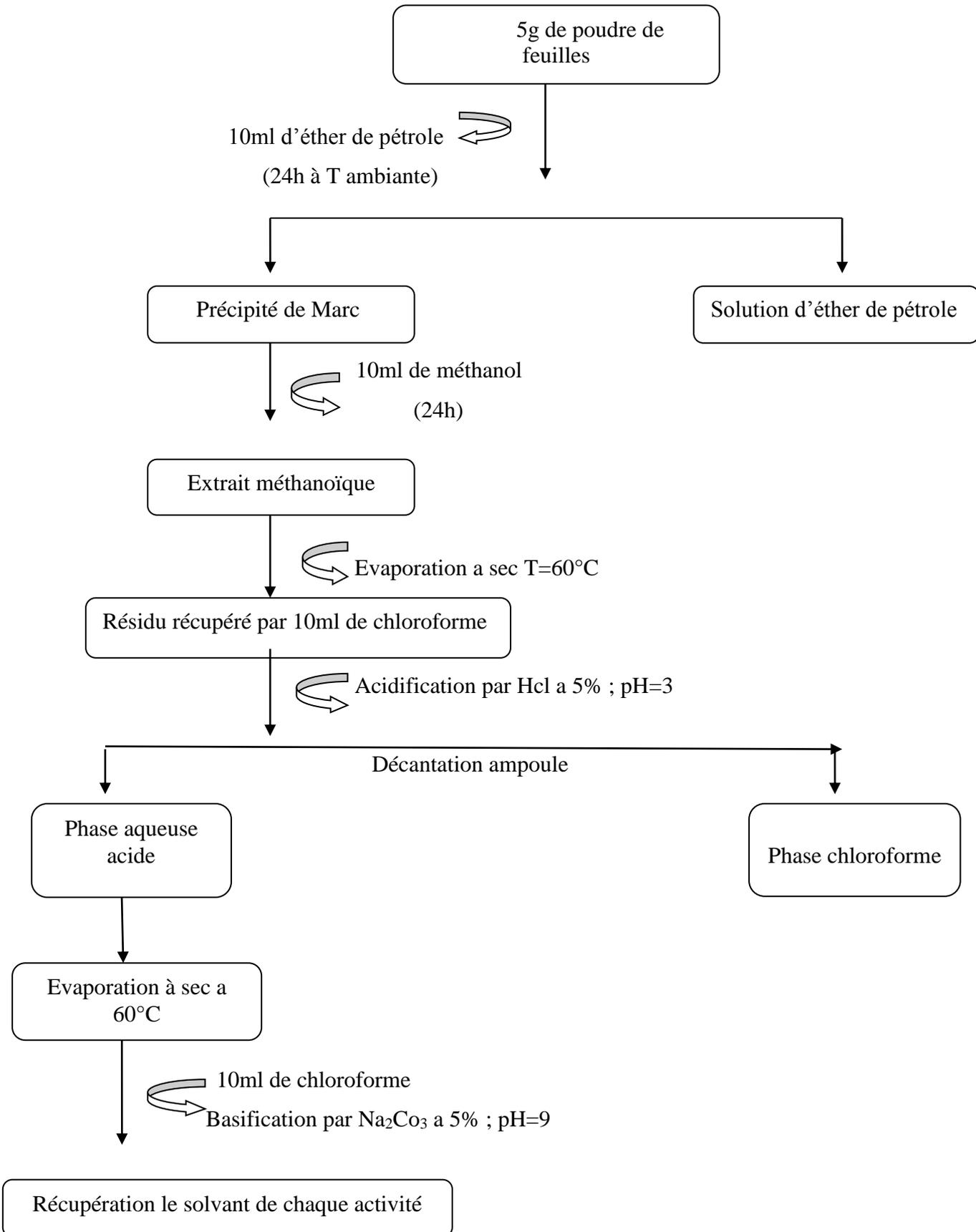


Figure 13 : Schéma d'extraction des alcaloïdes totaux (HARBONE, 1998).

1.3. Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes

1.3.1. Les Alcaloïdes

L'estimation de la teneur en alcaloïdes a été effectuée par la méthode spectrophotométrique suivant le protocole de PATEL *et al*(2015) et TABASUM *et al* (2016). Une courbe étalon a été réalisée avec la colchicine pour des concentrations 10 et 100 µg/ml. La spectrophotométrie permet l'étude de solutions colorées dans l'infrarouge (1 100 nm au maximum), dans le visible et dans l'ultraviolet (190 nm).

L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 380 nm est proportionnelle à la quantité d'alcaloïdes présents dans la fraction végétale et l'extrait aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L. L'absorbance est mesurée contre un blanc contenant tous les réactifs sauf nos extraits.

La concentration des alcaloïdes de nos extraits est déterminée par extrapolation sur la courbe étalon.

Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de colchicine par milligramme d'extrait (µg eq colchicine/ml fraction) (Figure 14).

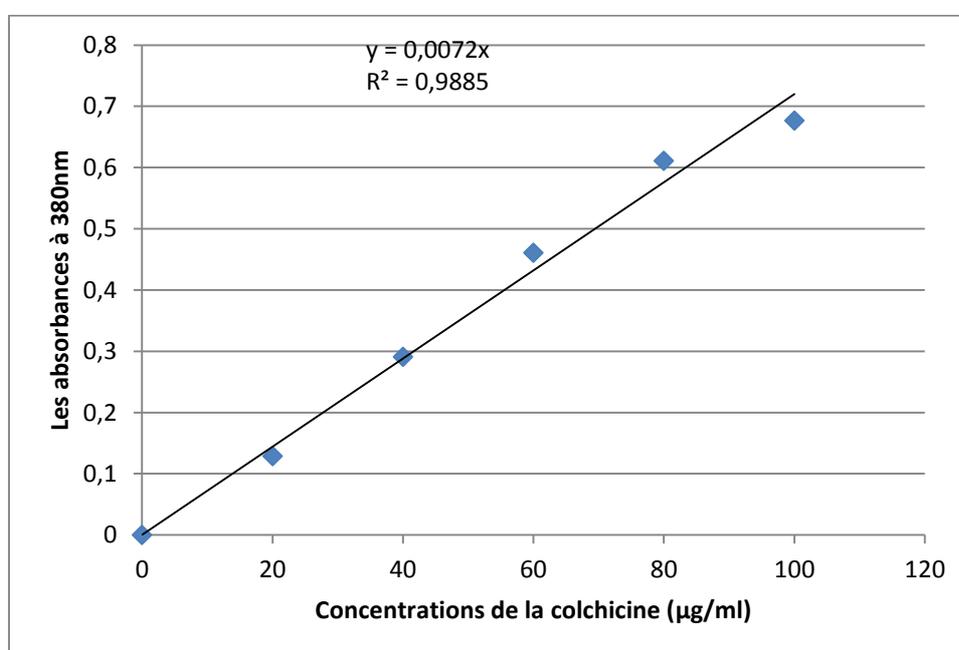


Figure 14 : Courbe étalon de colchicine

1.3.2. Flavonoïdes

Nous avons utilisé la méthode de BAHORM *et al.*, (1996), qui ce résume dans le schéma suivant :

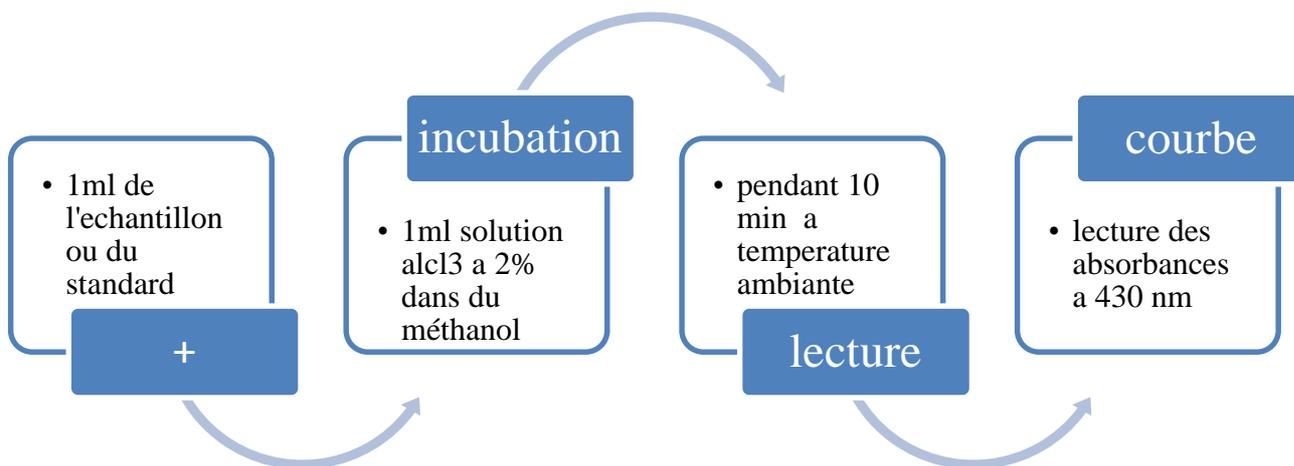


Figure 15 : Schéma d'extraction des flavonoïdes (BAHORU *et al.*, 1996)

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine, et sont exprimées en microgramme équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (mg eq/mg extrait) (Figure 16).

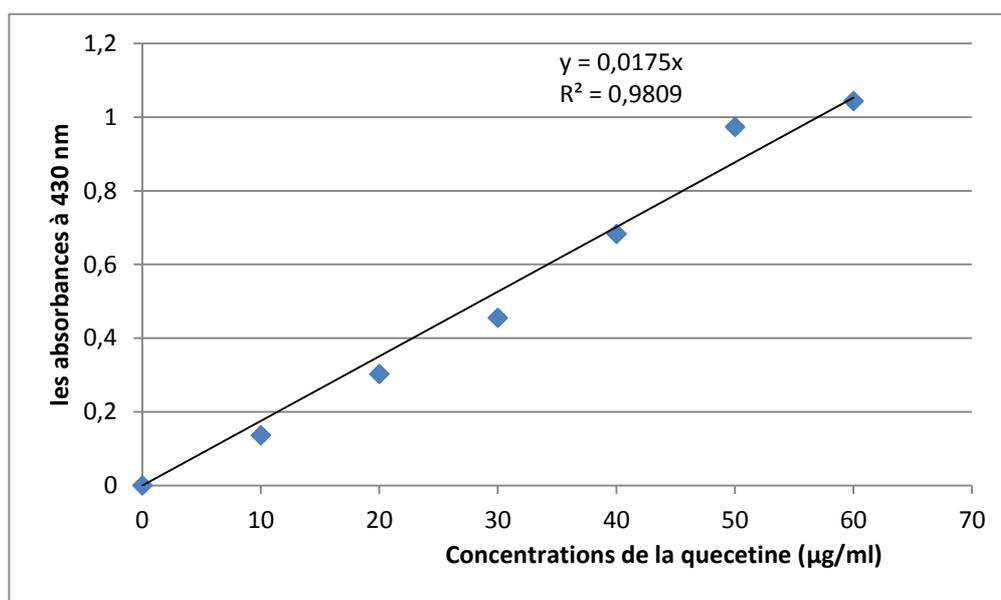


Figure 16 : Courbe étalon de la quercétine .

1.4. Activités biologiques

1.4.1. L'activité antimitotique

Obtenus du marché local, des bulbes d'oignon *Allium cepa* L. ($2n = 16$) de même calibre sont soigneusement débarrassés de la partie brunâtre, placés dans des béchers contenant de l'eau pendant 72 heures à température ambiante du laboratoire.

Après germination, les apex racinaires d'un centimètre (1 cm) de long sont fixés dans une mixture fraîchement préparée d'un volume d'acide acétique et de trois volumes d'éthanol 95% (1 : 3 V/V) pendant 45 min, puis le surplus est enlevé. La fixation a pour but de bloquer toute évolution de divisions cellulaires et permet de conserver l'intégrité structurale des chromosomes (JAHIER, 1992). Le carmin acétique est utilisé pour sa double action de fixateur/colorant et permet l'observation des noyaux.

A l'aide d'un scalpel, la partie méristématique hydrolysée et colorée (2 mm environ) est isolée, déposée sur une lame dans une goutte de carmin acétique à 45%. L'échantillon ainsi préparé est écrasée entre lame et lamelle en tapotant doucement avec le bout d'une allumette, afin d'obtenir un bon étalement des cellules. L'observation se fait au microscope optique au grossissement 400. Les lames sont observées de droite à gauche et du haut vers le bas. Le comptage des cellules normales ou aberrantes est réalisé sur des cellules par concentration en extrait à raison de 350 cellules par apex racinaire, en prenant en compte les phases de la division cellulaire : prophase (P), métaphase (M), anaphase (A) et télophase (T).

Les étapes suivies pour la réalisation du test d'*Allium cepa* sont réalisés suivant le Protocole de SHWETA *et al.*; (2012) et OUZID *et al.*, (2018) (Figure 17).

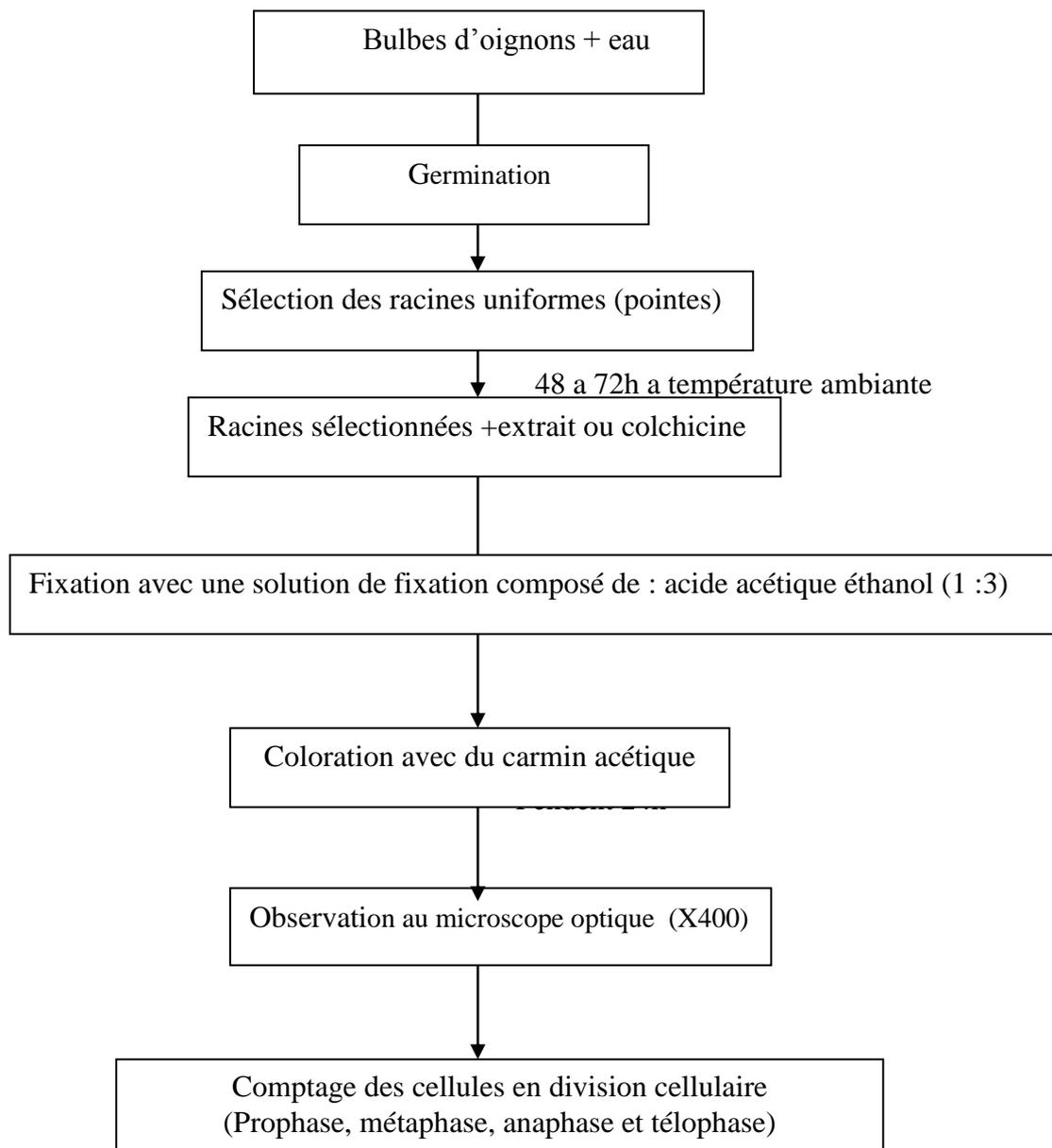


Figure 17 : Schéma de l'évaluation de l'activité antimitotique (SHWETA *et al.*, 2012).

L'analyse cytogénétique est réalisée par l'évaluation de quatre (4) paramètres biologiques. Pour chaque échantillon, 5 essais ont été réalisés. Les paramètres évalués sont :

-Indice mitotique (IM)

Cet indice consiste à comptabiliser le pourcentage des cellules arrêtées en mitose sur le total des cellules examinées (350 cellules) (SHWETA *et al.* , 2012).

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

- Indice des phases (IP)

Cet indice est calculé afin de déterminer le pourcentage des cellules dans chaque phase de la mitose (Prophase, Métaphase, Anaphase et Télophase) (GLINSKA *et al.*, 2007 ; FASLA, 2009).

$$\text{IP}\% = \frac{\text{Nombre de cellules en différentes phases}}{\text{Nombre total de cellules examinées}} \times 100$$

- Indice des aberrations (IA)

Les aberrations chromosomiques rencontrées sont de différents types :

AG (agglutination chromosomique), CB (cellules binuclées), AL (allongement des cellules), PC (pont chromosomique), FR (fragmentation chromosomique), DP (désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase), CG (cellules gigantesque), CS (cellules sans noyau), CA (corps apostoliques), AC (absence de cytotdiérèse).

L'indice des aberrations (IA%) est calculé selon RACUCIUR et CREANGA (2007) comme suit :

$$\text{IA}\% = \frac{\text{Total des aberrations chromosomiques}}{\text{Total des cellules analyses}} \times 100$$

- Valeur limite de cytotoxicité

La Valeur limite de cytotoxicité (VLC %) est calculée selon la méthode de SHARMA (1983), PANDA et SAHU (1985) et ANTONSIE-WIEZ (1990) à partir de la formule suivante:

$$\text{VLC\%} = \frac{\text{IM des cellules traitées}}{\text{IM des cellules témoin}} \times 100$$

1.4.2. Evaluation de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux sur la membrane érythrocytaire

Dans le présent travail le recours à l'utilisation de globules rouges vise à étudier l'action des extraits d'alcaloïdes de *Peganum harmala* sur l'intégrité membranaire érythrocytaire. Pour cela nous avons suivi le protocole de DUCHNOWICZ(2012).

1.4.2.1. Préparation de la suspension d'hématies à 2%

Du sang frais a été prélevé d'un volontaire sain dans des tubes héparines. Le sang est centrifugé à 2500 tours pendant 5min. Après élimination du plasma, le culot est lavé trois fois par une solution isotonique (NaCl à 0.9 %). A chaque lavage, la suspension érythrocytaire est homogénéisée puis centrifugée à 2500 tours pendant 5 min. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire des globules rouges est reconstitué sous forme de suspension à 2% avec la solution isotonique.

1.4.2.2. Action sur la membrane érythrocytaire

L'action des extraits analysés à savoir la fraction des alcaloïdes et les extraits aqueux est déterminée par sa capacité à lyser la membrane érythrocytaire. Cette cytolyse est appréciée par la quantité d'hémoglobine libérée. Pour cela nous nous sommes basés sur la méthode décrite par DUCHNOWICZ(2012).

1ml de la suspension érythrocytaire à 2% est mise au contact pendant 20 min avec l'eau physiologique (témoin négatif), saponine (témoin positif) et sur deux échantillons, la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux à 4mg/ml et à 10mg/ml. Après 20 min d'incubation, et après centrifugation à 2500 tours, nous avons déterminé ensuite la densité optique du surnageant à 560nm selon le protocole annoncé dans la figure 18.

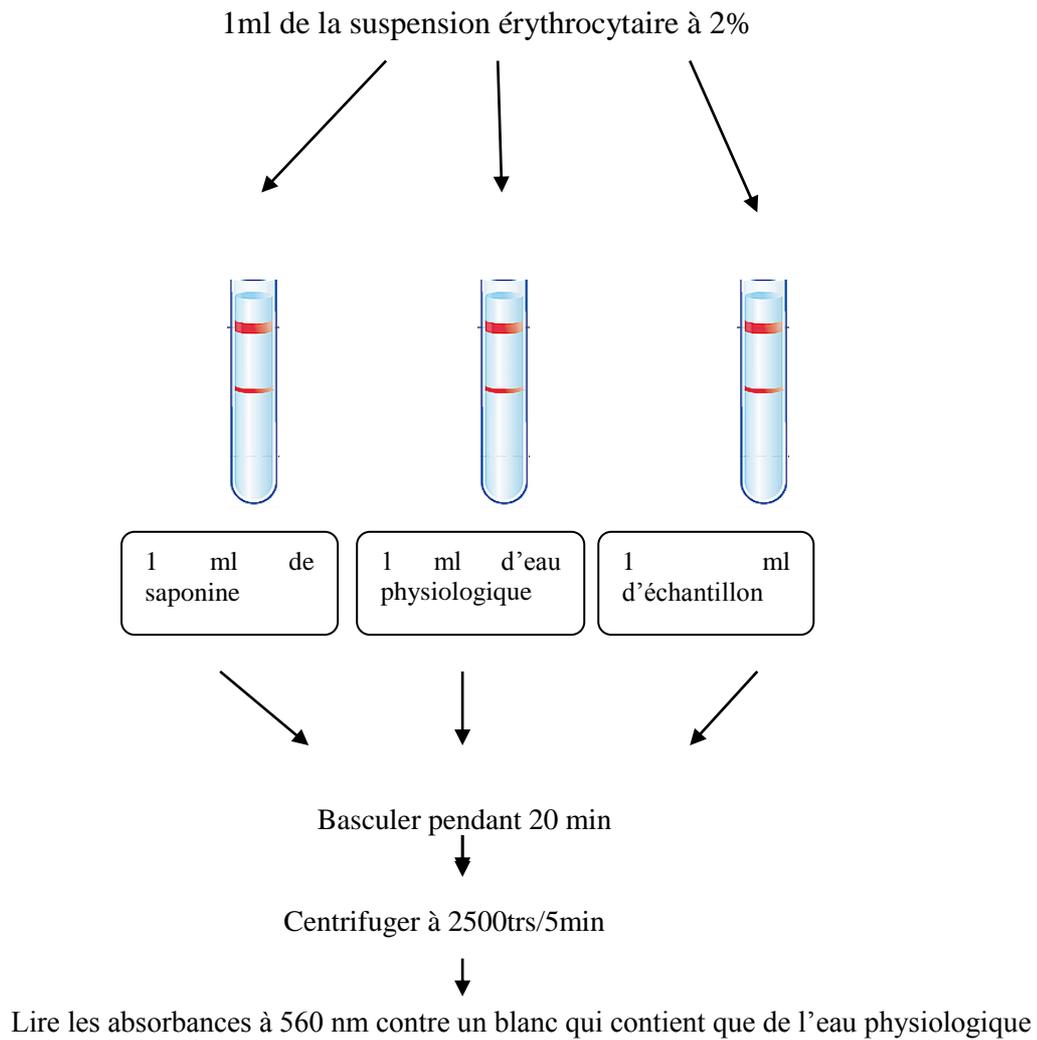


Figure 18 : Les différentes étapes du test de l'activité hémolytique selon le protocole DUCHNOWICZ(2012).

Les densités optiques obtenues sont proportionnelles à la quantité d'hémoglobine libérée. A partir des densités optiques, nous avons calculé le pourcentage d'hémolyse selon la formule ci-dessous. Les valeurs obtenues permettent d'évaluer la cytotoxicité de différents extraits, vis-à-vis des membranes des globules rouges humains.

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{\text{DO}_E - \text{DO}_B}{\text{DO}_{T+}} \times 100$$

-DO_E: absorbance de l'échantillon ;

-DO_B : absorbance de l'extrait végétal et eau physiologique (sans suspension de globule rouge) ;

-DO_{T+} : absorbance du témoin positif qui est la saponine.

1.5. Analyses statistiques des résultats

Les résultats obtenus dans notre étude, sont soumis à un test spastique d'ANOVA à un seul facteur, au seuil $\alpha= 5\%$, en utilisant le logiciel STATISTICA, afin de déterminer la significativité de nos résultats.

II. Résultats et discussions

2.1. Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes

2.1.1. Dosage des alcaloïdes

Les concentrations des alcaloïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la colchicine, et sont exprimées en microgramme équivalents de colchicine par millilitre de la fraction des alcaloïdes ($\mu\text{g EC/ml fraction}$)

La concentration en alcaloïdes totaux est de $220 \mu\text{g EC/ml}$ de fraction dans la fraction alcaloïdes. Par contre, leur teneur au niveau de l'extrait aqueux est estimée à $28,42 \mu\text{g EC/mg}$ d'extrait. Cette différence pourrait être dû à la méthode d'extraction utilisée pour la fraction, qui s'avère plus efficace avec l'utilisation de solvants organique (Annexe 1).

2.1.2. Dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine, et sont exprimées en microgramme équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC/mg d'extrait}$).

Le dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux a révélé une concentration de $12.52 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extraits (Annexe1).

2.2. Etude de l'indice mitotique et de l'indice de phase

L'analyse des cellules méristématiques d'*A cepa* traitées par notre fraction extraite des feuilles de *Peganum harmala* L. révèle une diminution remarquable de l'indice mitotique (Figure 19). Le taux a atteint $36.60 \pm 1.47\%$ ce qui correspond à moins de la moitié de celui calculé pour le témoin négatif ($92.20 \pm 1.34\%$). Cet indice se rapproche de la valeur de l'indice mitotique des racines traitées avec le témoin positif qui est de $35.00 \pm 1.16\%$, avec la dominance de la prophase dont l'indice de phase est égal à $119.40 \pm 6.87\%$. Notons que l'indice de métaphase est nul pour la fraction des alcaloïdes et les extraits aqueux (Tableau II).

L'analyse des extraits aqueux aux différentes concentrations de 4 mg/ml et de 10 mg/ml révèle également une diminution de l'indice mitotique avec des valeurs successive de $32.2 \pm 0.73\%$ et de $40.2 \pm 2.55\%$. Ces valeurs sont faibles comparées au témoin négatif. Nous observons aussi que l'indice mitotique des cellules meristématiques d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux à 4 mg/ml est le plus faible et se rapproche le plus de la valeur du témoin positif (35.00 ± 1.16). L'analyse révèle également la dominance de la prophase (Figure 20).

avec des indices de phases de $102.6 \pm 1.65\%$ à la concentration 4mg/ml et de $117.4 \pm 5.33\%$ à 10mg/ml avec l'absence de métaphase (Tableau II).

L'indice mitotique est considéré comme un paramètre permettant d'estimer la fréquence de la division cellulaire (MARCANO *et al.*, 2004). La diminution de l'activité mitotique chez les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* L. indique un effet mitodépressif de la fraction et des extraits aqueux de *Peganum harmala* L. De pareils effets mitodépressifs ont été observés chez des cellules méristématiques d'*A. cepa* traitées par des extraits aqueux de cinq plantes médicinales utilisées en pharmacopée Nigérienne : *Azadirachta indica* A. JUSS ; *Morinda ludica* Benth ; *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, *Mangifera indica* L. et *Carica papaya* L. aux concentrations suivantes : 1, 2.5, 10, 20 % (m/v) (AKINBORO et BAKARE, 2007). La réduction de l'activité mitotique pourrait être due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et des nucléoprotéines du système biologique (CHAUHAN *et al.*, 1998) et à la modification ou une altération dans l'expression de certains gènes. (SIDDIQUI *et al.*, 2007).

L'augmentation du nombre de prophases chez des cellules d'*A. cepa* traitées par les extraits aqueux et la fraction des feuilles de *Peganum harmala* laisse suggérer selon D'AMATO(1954), que cela est dû, soit à une durée de traitement trop longue, soit à l'utilisation de doses trop élevées, ce qui aboutit au ralentissement de l'entrée aux autres stades de la mitose, notamment, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

L'analyse statistique type ANOVA des indices mitotiques des différents extraits a montré des différences significatives entre l'extrait aqueux à 4mg/ml et l'extrait aqueux à 10 mg/ml ($P=0.02$). La différence est significative entre la fraction alcaloïdes et l'extrait aqueux à 4mg/ml ($P=0.04$). Par ailleurs, des différences hautement significatives ont été observées entre le témoin positif et le témoin négatif ($P=0.00$), entre le témoin négatif et la fraction alcaloïdes ($P=0.00$), entre le témoin négatif et l'extrait aqueux à 10 mg/ml ($P=0.00$), ainsi que pour le témoin négatif et l'extrait aqueux à 10 mg/ml ($P=0.00$). Cependant, des différences non significatives ont été observées pour les indices de phases que ce soit pour les extraits aqueux que pour la fraction d'alcaloïdes (Annexe 4).

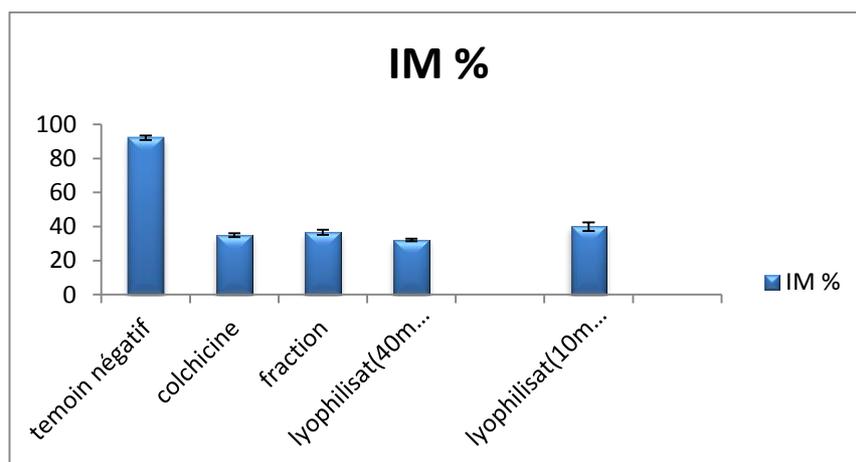


Figure 19: Histogramme montrant la diminution des indices mitotiques.

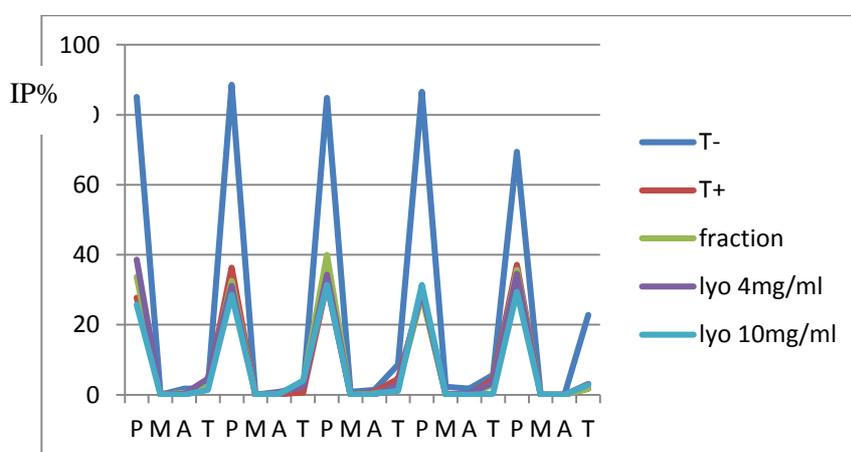


Figure 20: Histogramme des indices de phases.

Tableau(II) : Indices mitotiques et indices de phase

Indices %	IM±E	P±ES	M±ES	A±ES	T±ES
S					
Témoin négatif	92,20±1,34	82,91±3,07	0,62±0,39	0,96±0,35	7,98±3,52
Témoin positif	35,00±1,16	32,28±1,73	0,11±0,05	0,28±0,13	2,85±0,70
Fraction	36,60±1,47	119,4±6.87	0,00±00	1,00±0,44	8,80±0,79
Extrait aqueux 4mg/ml	32,20±0,73	102,60±1.65	0,00±00	0,40±0,108	6,80±1,032
Extrait aqueux 10mg/ml	40,20±2,55	117,40±5,33	0,00±00	1,00±0,54	10,80±1,49

IM: indice mitotique, P: prophase, M: métaphase, A: anaphase, T: télophase

2.3. Etude des aberrations et anomalies chromosomiques

2.3.1. Les aberrations chromosomiques

L'analyse cytogénétique des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par la fraction et les extraits aqueux des feuilles *Peganum harmala* L. indique la présence de différents types d'anomalies de la division cellulaire (Figure 21). Ces anomalies sont exprimées par des taux variables d'indice d'aberration par rapport au témoin positif (colchicine) (Tableau III). Les principales anomalies observées sont:

- **agglutination chromosomique (Figure 22 AG)** : le taux de cette aberration est plus élevé pour les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par l'extrait aqueux à 4mg/ml ($14.74 \pm 0.87\%$) comparé au témoin positif ($5.60 \pm 1.42\%$). Par contre il est supérieur au témoin positif pour les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec la fraction et l'extrait aqueux à 10mg/ml avec des taux de $12.62 \pm 0.77\%$ et $8.17 \pm 1.28\%$ respectivement ;
- **cellules binuclées (Figure 22 CB)** : comparé au témoin positif qui a un indice d'aberration de $0.74 \pm 0.66\%$, l'extrait aqueux à 4mg/ml présente un indice plus important de l'ordre de $1.25 \pm 0.33\%$. Cette aberration n'a pas été observée chez les cellules traitées par l'extrait aqueux à 10mg/ml. Par contre cet indice est de $0.22 \pm 0.1\%$ pour la fraction alcaloïde, inférieure à l'indice du témoin positif ;
- **allongement des cellules (Figure 22 AL)** : cette aberration n'est observée que chez les cellules traitées par l'extrait aqueux à 10mg/ml avec un indice de $0.74 \pm 0.55\%$, qui se rapproche de l'indice d'aberration du témoin positif ($0.86 \pm 0.48\%$) ;
- **fragmentation chromosomique (Figure 22 FR)** : les indices de cette aberration sont relativement faibles pour la fraction ($0.17 \pm 0.07\%$) ainsi que pour l'extrait aqueux à 4mg/ml et à 10mg/ml ($0.45 \pm 0.45\%$) comparativement au témoin positif. L'indice le plus faible est observé chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux à 4mg/ml qui est de $0.05 \pm 0.05\%$ comparé au témoin positif ($1.89 \pm 0.55\%$) ;
- **désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase (Figure 22 DP)** : l'extrait aqueux à 10mg/ml présente l'indice le plus élevé ($0.85 \pm 0.20\%$) par rapport au témoin positif ($0.23 \pm 0.14\%$). Par contre cet indice est inférieur à celui du témoin pour la fraction alcaloïde ($0.11 \pm 0.05\%$) et l'extrait aqueux à 4mg/ml ($0.17 \pm 0.03\%$) ;
-

- **cellules gigantesque (Figure 22 CG)** : l'indice de cette aberration est inférieur à celui du témoin positif pour les cellules traitées par la fraction alcaloïde et l'extrait aqueux à 10mg/ml. Pour l'extrait aqueux à 4 mg/ml aucune aberration de ce type n'est observée ;
- **corps apoptotique (Figure 22 CA)** : l'indice de cette aberration pour la fraction alcaloïde est égal à celui rencontré chez le témoin positif est correspond à 0.17 ± 0.15 . Aucune aberration n'est observée avec les autres extraits (Annexe2).

Les aberrations chromosomes observées indiquent l'effet de l'extrait aqueux et de la fraction des feuilles de *Peganum harmala* L. sur l'organisation de la chromatine. Ceci qui peut être en relation avec des troubles dans la quantité des histones, ou autres protéines, responsables du contrôle de la structure de la chromatine nucléaire (STRYER, 1997). La condensation de la chromatine peut être produite suite à des conditions de stress (FUSCONI *et al.*, 2006).

L'analyse statistique type ANOVA a montré des différences non significatives entre les indices d'aberrations pour nos différents extraits, traduisant ainsi un effet similaire de nos extraits avec la colchicine (témoin positif) (Annexe 3).

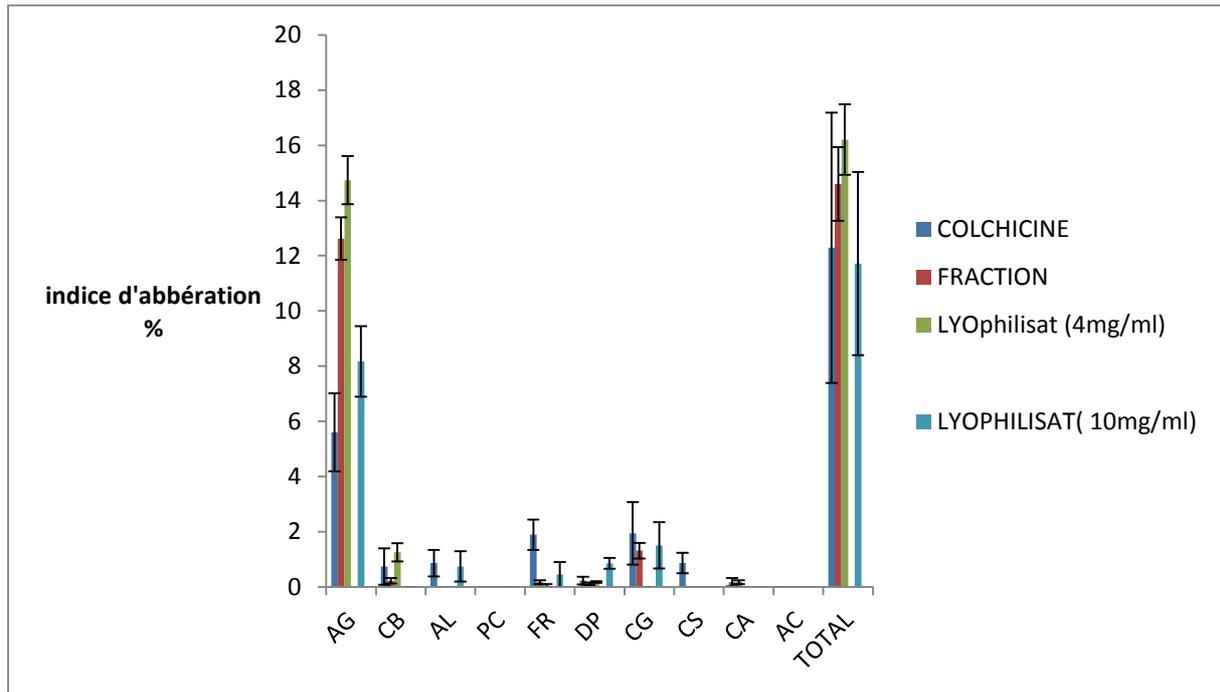


Figure 21 : Histogramme des différentes aberrations observées sous l'effet des l'extrait aqueux et de la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L.

Tableau III : Indices d'aberrations et anomalie rencontrées

Indice d'aberrations %	AG±ES	CB±ES	AL±ES	PC±ES	FR±ES	DP±ES	CG±ES	CS±ES	CA±ES	AC±ES	Total ±ES
Témoin positif	5,60± 1,42	0,74± 0,66	0,86± 0,48	0,00± 0,00	1,89± 0,55	0,23± 0,14	1,94± 1,13	0,86± 0,37	0,17± 0,15	0,0± 0,00	12,29± 4,90
Fraction	12,62± 0,77	0,22± 0,10	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,17± 0,07	0,11± 0,05	1,31± 0,28	0,00± 0,00	0,17 ± 0,07	0,0± 0,00	14,6 ± 1,34
Extrait aqueux (4mg/ml)	14,74± 0,87	1,25± 0,33	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,05± 0,05	0,17± 0,03	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,0± 0,00	16,21± 1,28
Extrait aqueux (10mg/ml)	8,17± 1,28	0,00± 0,00	0,74± 0,55	0,00± 0,00	0,45± 0,45	0,85± 0,20	1,5± 0,84	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,0± 0,00	11,71± 3,32

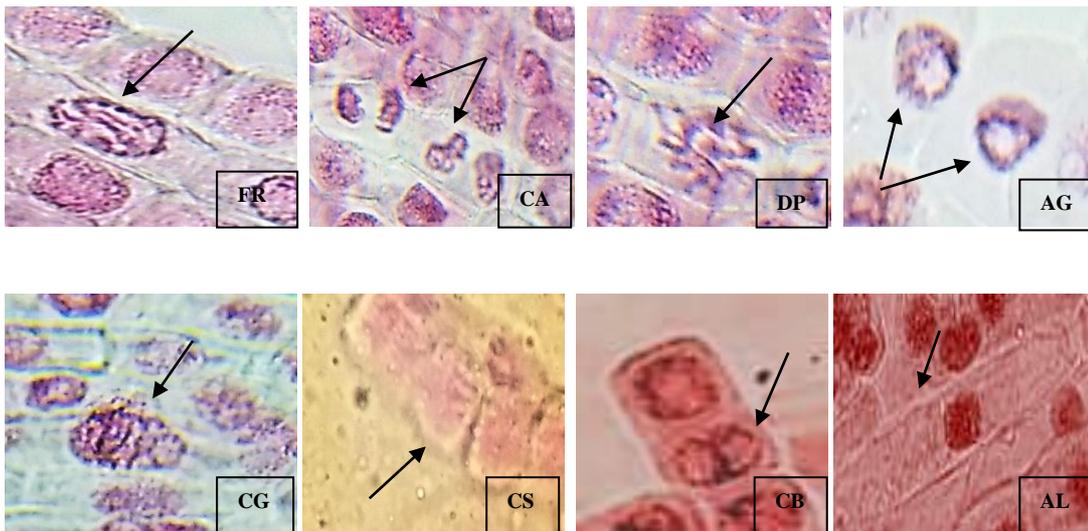


Figure 22 : Les différentes aberrations observées chez les cellules méristématiques d'*Allium cepa* , vues sous microscope optique (X400) .

AG : agglutination chromosomique .**FR**: fragmentation chromosomique. **DP**: désorganisation de la plaque équatoriale en métaphase. **CG**: cellules gigantesque .**CA**: corps apoptotique, **CB** : cellule binucléée, **AL** :cellules allongé . **CS** : cellules sans noyau

2.4. Valeurs limites de cytotoxicité

Le tableau VI regroupe les indice mitotique (IM %) et valeur limite de cytotoxicité (VLC %) des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par l'extrait aqueux et la fraction des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. comparés au témoin positif.

TableauIV : les valeurs limites de cytotoxicité

Echantillon	IM±ES %	VLC±ES
Témoin positif	35.00±1.16	37.95 ±1.26
Fraction	36.6±1.47	39.69 ±1.69
Extrait aqueux (4mg/ml)	32.2±0.73	40.99± 2.58
Extrait aqueux (10mg/ml)	40.2±2.55	34.92 ±0.71

Quand l'indice mitotique diminue en dessous de 22% du témoin il provoque ce qu'on appelle «l'effet létal» sur les organismes test (ANTONSIIEWICZ, 1990). Une diminution de l'indice mitotique de 50 % par rapport au témoin est habituellement un effet sublétal (PANDA et SAHU, 1985) et est nommée «valeur limite de cytotoxicité» (SHARMA, 1983). Selon ces deux définitions on pourra déduire que seul l'extrait aqueux à 4mg/ml des feuilles de *P. harmala* L. qui est considéré comme sublétal pour les cellules d'*A. cepa*, Un tel résultat a été signalé par FASLA (2009)

L'analyse statistique type ANOVA a montré des différences significatives entre la VCL de la fraction et celle de l'extrait aqueux à 4mg/ml est avec $P=0.03$ (Annexe 4)

2.5. Evaluation de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux sur la membrane érythrocytaire

L'évaluation des activités biologiques des extraits naturels, nécessite une étude de l'activité hémolytique (GREEN, 2004 ; NCUBE *et al.*, 2008).

Le tableau V représente les pourcentages d'hémolyse des fractions à deux concentrations différentes, des extraits aqueux à 4 et 10 mg/ml et du témoin positif. Les fractions d'alcaloïdes totaux ont montré des pourcentages d'activité hémolytique variant entre 7,3% et 7,5%. Ces taux sont inférieurs au pourcentage d'hémolyse du témoin positif (100%). L'hémolyse est plus importante pour les globules rouges traités par les extraits aqueux comparée à celles traitées par la fraction. L'hémolyse maximale a été observée dans les cellules traitées par l'extrait aqueux à 10mg/ml (12.94%) considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouges. mais ce pourcentage reste faible comparé au témoin positif. Ceci suggère que les fractions et les extraits aqueux utilisés présentent une faible toxicité.

Nos résultats sont en accord avec les conclusions de RENGASAMY *et al.*, (2013) qui ont montré que les extraits aqueux, de plusieurs plantes étudiées, ont des effets hémolytiques faibles contre les érythrocytes humains.

Tableau V : Les pourcentages d'hémolyse des fractions alcaloïdes et des extraits aqueux

	DO±ES	% d'hémolyse
Témoin négatif	00±00	0
Témoin positif	1.8±00	100
Fraction 1	0.136±0.02	7.5
Fraction 2	0.132±0.01	7.3
Extrait aqueux à 4mg/ml	0.165±0.003	10.38
Extrait aqueux à 10mg/ml	0.233±0.01	12.94

CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre travail qui a porté sur l'étude de l'activité antimittotique et génotoxique des extraits aqueux et de la fraction des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L., réalisées sur les apex racinaires d'*Allium cepa* a montré : l'accumulation des cellules au stade prophase, la présence de chromosomes agglutinés, la présence de cellules à noyaux déformés, un effet cytotoxique sur les cellules, la présence de cellules à noyaux condensés, la suppression anormale du noyau et la fragmentation du cytoplasme et du noyau cellulaire.

Un effet mitodépressif sur les cellules méritématiques racinaires d'*Allium cepa* L. a été également observé avec l'extrait aqueux et la fraction des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. avec un effet subléthal de l'extrait aqueux à 4mg/ml.

Nous nous sommes également intéressés à évaluer l'activité hémolytique des extraits et de la fraction des feuilles de plante *Peganum harmala* L. vis-à-vis des globules rouges humains.

Les tests d'hémolyse réalisés par la méthode spectrophotométrique ont montré que l'extrait aqueux à 10mg/ml présente un effet hémolytique plus important comparativement à l'extrait à 4mg/ml et à celui de la fraction. Les tests biologiques, réalisés *in vitro*, sur des érythrocytes isolés du sang humain, en présence des extraits aqueux et la fraction des alcaloïdes aux différentes concentrations, montre un effet faiblement toxique. *Peganum harmala* L. peut donc être utilisé à des concentrations bien étudiées, dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques.

Il est serait judicieux d'examiner l'effet des extraits aqueux et de la fraction d'alcaloïdes sur d'autres systèmes eucaryotiques et par d'autres approches expérimentales, afin d'obtenir des informations additionnelles sur l'activité biologique de ces extraits, et qui devraient contribuer à l'élucidation de leurs mécanismes d'action. De telles approches pourraient comprendre, à titre d'exemples :

- la technique de cytométrie de flux, pour déterminer plus précisément le degré de ploïdie des noyaux ;

- il est intéressant aussi d'approfondir cette étude par purification des molécules phytochimiques responsables de l'activité biologique et évaluer leurs effet toxique *in vivo*.

- une étude toxicologique approfondie est nécessaire afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ADÃO, C. R., DA SILVA, B. P., et PARENTE, J. P. (2011)**. A new steroidal saponin with antiinflammatory and antiulcerogenic properties from the bulbs of *Allium ampeloprasum* var. *porrum*. *Fitoterapia*, 82(8), 1175-1180.
- **ASGARPANA H J., et RAMEZANLOO F. (2012)**. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(22), 1573-1580.
- AKINBORO A. ET BAKARE A.A. (2007)**. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 470–475.
- AL YAHYA M. A. (1986)**. Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia*, 52 (3): 179-182.
- ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. et WOLTER. (1997)**. L'essentiel de biologie cellulaire : Introduction à la biologie moléculaire de la cellule. Médecine- Science Flammarion, ed., p. 597.
- ANTONSIE-WIEZ D. (1990)** Analysis of the cell in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Ledakrin." *Folia Histochemical Cytobiology*.. 26, 79-96
- APG II. (2003)**. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, T. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical journal of the Linnean Society*, 141(4), 399-436.
- **ASGARPANA H J., et RAMEZANLOO F. (2012)**. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(22), 1573-1580.
- BAHORU T., GRINIER B., TROTIN F., BRUNET G., PIN T., LUNCKY M., VASSEUR J., CAZIN C., CAZIN C. et PINKAS M. (1996)**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations *Arzneimittel-Forschung*. 46(11), 1086-1089

- BELLAKHDAR J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle; Médecine arabe et ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. p.247.
- BÉZANGER-BEAUQUESNE, L., PINKAS, M., TORCK, M., et TROTIN, F. (1980).** Medicinal plants of temperate regions. *Medicinal plants of temperate regions*.
- BONNARD, I., et RINEHART, K. L. (2004).** Thyonosides A and B, two new saponins isolated from the holothurian *Thyone aurea*. *Tetrahedron*, 60(13), 2987-2992.
- BOTTA A. (2005).** Relations entre génotoxicité, mutagénèse et cancérogénèse. Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP. Annales, 28:9-13.
- BOUNIAS M. (1999).** Traité de toxicologie générale. Springer, ed., p.804.
- BRUNETON, J. (2009).** Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4e édition.
- CHAUHAN L.K.S., SAXENA P.N. et GUPTA S. K. (1998).** Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany*, 42:181-189.
- CHEN S.J., BRADLEY M.E. et LEE T.C. (1998).** Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.*, 178: 141–149.
- CHEVREMONT. M. (1979).** Cytologie et histologie. Maloine, ed., Paris. I : 686.
- CHOPRA I.C., ABRAL B.K. et HANDA K.L. (1960).** Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. UNESCO, ed., p. 48.
- CHOPRA R.N., CHOPRA I.C., HANDA K.L. et KAPUR L.D. (1958).** Chopra's Indigenous Drugs of India, 2nd ed. UN Dhur and Sons Pvt. Ltd., Calcuttta, India. p. 370.

-D'AMATO F. (1954). Action des facteurs physiques et chimiques sur la mitose. *Int. Botanique*, 9 : 1-9. *In* Deysson G., 1956.

-DIAB, Y., IOANNOU, E., EMAM, A., VAGIAS, C. et ROUSSIS, V. (2012). Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. *Steroids*, 77:686–690.

-DODGE, J. T., MITCHELL, C., et HANAHAN, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 100(1), 119-130.

-DUKE, 1929. Duke JA. *Handbook of Biological Active Phytochemicals and their Active Phytochemicals and their Activities*. CRC Press, 1992; Boca Raton, FL

-DUSTIN. P. (1956). Les facteurs de la mito-inhibition des cellules animales. Leur rôle dans la croissance mitotique chez les mammifères. V. p. 190-240 *In* André Thomas, 1956. *EDER et al.*, 1990).

-ELGSAETER, A., STOKKE, B. T., MIKKELSEN, A., et BRANTON, D. (1986). The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*, 234(4781), 1217-1223.

-EMBERGER L. (1960). *Traité de botanique systématique : Les végétaux vasculaires. II.* Masson et cte, ed., Paris, p. 441-862

-EPSIE M., EXTRA J.M., COTTU P.H., CUVIER C. et MARTY M. (1998). Médicaments anticancéreux. 69 : 917-945. *In* Schorderet M., 1998.

-FARNSWORTH N. R. (1968). Hallucinogenic plants. *Science* 162: 1086-1092.

-FASLA B. (2009). Evaluation du potentiel antimitotique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse Magister, Université d'Oran Es-sénia. Algérie, 172 p.

-FAVELIER J. (1995). Manuel de prévention des risques associés aux techniques biologiques. Elsevier Masson, ed., p. 365.

- FUSCONI, A., REPETTO, O., BONA, E., MASSA, N., GALLO, C., DUMAS-GAUDOT, E. et BERTA, G. (2006).** Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 253–260.
- GARAI S. (2014).** Triterpenoid Saponins. *Natural Products Chemistry & Research*, 148(2): 5- 6-7-8-9-10.
- GARRETT, R. H., et GRISHAM, C. M. (2000).** *Biochimie, 2e éd. Paris: DeBoeck Université*, 561-3.
- GIRARD, M., BELANGER, J., APSIMON, J. W., GARNEAU, F.,-X., HARVEY, C. et BRISSON, J.R. (1990).** Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa*. *Canadian Journal of Chemistry*, 68:11–18.
- GLINSKA. S, BARTEZAK. M, OLEKSIAK.S, WOLSKA. A, GABARA. B, POSMYK. M et JANAS. K. (2007).** Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa*. Root treated with heavy metals. *Ecotoxicology and environmental safety*. 68 : 343-350. GORDON *et al.*, 2005).
- Green RJ. (2004).** Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues. [Masters Thesis]. USA : North Carolina State University.
- GUERITTE et FAHY. (2005).** The vinca alkaloids. *In* Cragg G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., 2005.
- GUIGNARD J. L., COSSON L., HENRY M. (1985).** *Abrégé de phyto-chimie*. Masson, Paris, pp 175- 191.
- HAMMICHE V. et MERAD R. (1990).** *Peganum harmala*. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph 402. Plant.
- HARBONE, J. B. (1998).** A guide to modern techniques of plant analysis. *Pytochemical methods, 3rd edition. Published by Chapman and Hall, London.*
- HARTWELL J.L. (1982).** Plants Used Against Cancer. Quarterman, Lawrence, MA. *In* Cragg *et al.*, 2005.

- HERBERT R. B. (1989).** The Biosynthesis of secondary metabolites. 2^{ème} Edition: Chapman and Halle. p 2, 11-115.
- HOSTETTMANN K. et MARSTON A. (1995).** Saponins, (Chemistry pharmacology of natural products). Cambridge : Cambridge University Press.
- JAHIER J. (1992).** Techniques de cytogénétique végétale. INRA, ed., Paris. p. 181.
- KALININ V. I., AVILOV S. A., KALININA E. Y., KOROLKOVA O. G., KALINOVSKY A. I., STONIK V. A., RIGUERA R., JIMÉNEZ, C. (1997).** Structure of Eximisoside A, a novel triterpene glycoside from the far-Eastern sea cucumber *Psolus eximius*. *Journal of Natural Products*, 60:817–19.
- KARP G. (1998).** Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts et expériences. De Boeck université, ed., Bruxelles. p. 665.
- KARTHISHWARAN K., MIRUNALINI S., DHAMODHARAN G., KRISHNAVENI M., et ARULMOZHI V. (2010).** Phytochemical investigation of methanolic extract of the leaves of *Pergularia daemia*. *J Biol Sci*, 10(3), 242-246.
- LACAILLE-DUBOIS M.-A., DELAUDE C., MITAINE-OFFER A.-C. (2013).** Triterpenoid saponins: a focus on Polygalaceae in *Handbook of Natural Products*, K. G. Ramawat, J. M. Mérillon (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 104, pp 3205–32.
- LACAILLE-DUBOIS M.-A., WAGNER H. (2000).** Bioactive saponins from plants: an update in: *Studies in Natural Products Chemistry Series*, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Elsevier Science, Vol. 21, pp 633–87.
- LACAILLE-DUBOIS M.-A. (1999).** Saponins as immunostimulants and immunoadjuvants in: *Immunomodulatory agents from plants*, H. Wagner, Basel, Boston, Berlin (Eds.). Birkhäuser Verlag AG, pp 243–72.
- LACAILLE-DUBOIS M.-A. (2005a).** Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: Recent developments, Atta-Ur-Rahman (Eds.), *Studies in natural products chemistry series*, vol. 32. Elsevier, Amsterdam; pp 209–46.

-LACAILLE-DUBOIS M.-A. (2005b). Bioactive saponins from plants: recent developments in "Handbook of Medicinal Plants", Yaniv Z., Bachrach, U. (Eds.). Food Products Press (FPP). The Haworth Medical Press (HMP): New York, Chapter 19, pp 399–428

-LACAILLE-DUBOIS M.-A. (2005c). Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments in: Studies in Natural Products Chemistry Series, Atta-Ur-Rahman (Eds.). Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 32, pp 209–46. LEE et XIAO, 2005.

-LEMMICH E., CORNETT C., FURU P., JORSTIAN C. L., KNUDSEN A. D., OLSEN C. E., SALIH A., et THILBORG S. T. (1995) Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. *Phytochemistry*, 39:63–68.

-LEONARD A. (1990). Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques. Masson, ed., Paris. p. 306.

-MABUCHI I. (1986). Biochemical Aspects of Cytokinesis. *Int. Rev. Cytol.*, 101:175-213.

-MANASE M.J. (2014). Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae. HAL Id: tel-01015619 <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01015619> Submitted on 26 Jun 2014.

-MAILLET M. (1977). Abrégé de cytologie. Masson, ed., Paris. p. 12-14. Maillet M., 2002. *Biologie cellulaire*. Masson, ed., Paris. p. 257-274 MAIRE, 1933.

-MANAARGADOO-CATIN M., ALI-CHERIF A., POUGNAS J.-L., et PERRIN C. (2016). Hemolysis by surfactants—A review. *Advances in colloid and interface science*, 228, 1-16.

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

-MARCHAND A., GALEN R. S. et VAN LENTE F. (1980). The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease. *Jama*, 243(19), 1909-1911.

-MAUSSANG G. (2005). Rapport ENS. <http://www.eleves.ens.fr/home/maussang/index.html>.

- MEIJER L. ET RAYMOND E. (2003).** Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Accounts of Chemical Research* 36: 417–425.
- MOHANDAS N., et GALLAGHER P. G. (2008).** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948.
- MORAES G., NORHCOTE P. C., KALININ V. I., AVILOV S. A., SILCHENKO A. S., DMITRENOK P. S., STONIK V. A., LEVIN V. S. (2004).** Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:637–650. NATH *et al.*, 1993.
- NCUBE NS., AFOLAYAN AJ., et OKOH AI. (2008).** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin : current methods and future trends. *Afri J Biotech*; 7 (12) : 1797 – 1806.
- O’HEARN E. et MOLLIVER M.E. (1993).** Degeneration of Purkinje cells in parasagittal zones of the cerebellar vermis after treatment with ibogaine or harmaline. *Neuroscience*, 55: 303–310.
- OZENDA P. (1958).** Flore du Sahara septentrional et central. CNRS, ed., Paris. p. 486.
- PANDA B.B et SAHU. U.K. (1985).** Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfotion. *Cytobios*, 42: 147-155.
- PARIS R. et DILLEMANN G. (1960).** Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue pharmacologique, UNESCO, ed., p. 71-72.
- PARIS M., HURABIELLE M., et PARIS R-R. (1981).** Abrégé de matière médicale: Monographies (2. partie): plantes actives sur le système nerveux, sur l'appareil digestif, plantes cardiotoniques, plantes antiparasitaires, plantes insecticides, antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale. Masson.
- PODOLAK I., GALANTY A., et SOBOLEWSKA D. (2010).** Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9:425–74.

-POMMIER Y et KOHN KW. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine Sciences*, 19: 173-186.

-QUEZEL P. et SANTA S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed., T2, p. 59.

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

-PATEL R. K., PATEL J.B., TRIVEDI P. D. (2015). Spectrophotometric method for estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its formulations.

-RENGASAMY RRK., RADJASSEGARIN A., PALANISAMY I., THIRUNAVUKARASU T., et PERUMAL A. (2013). In vitro antibacterial, cytotoxicity and haemolytic activities and phytochemical analysis of seagrasses from the Gulf of Mannar, South India. *Food Chemistry*, 136(3-4): 1484 -1489.

-SAUTOUR M., MIYAMOTO T., et LACAILLE-DUBOIS M-A. (2007a). Steroidal saponins from *Asparagus acutifolius*. *Phytochemistry*, 68:2554–62.

-SCHAER D. J., BUEHLER P. W., ALAYASH A. I., BELCHER J. D., et VERCELLOTTI, G. M. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121(8), 1276-1284.

-SHARMA C.B. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Curr. Sci.*, 52: 1000–1002.

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

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

- SIDDIQUI S., MEGHVANSI M.K. et HASAN Z. (2007).** Cytogenetic changes induced by sodium azide (NaN₃) on *Trigonella foenum-graecum* L. seeds. *South African Journal of Botany*, 73 : 632–635.
- SIERRA L-M et GAIVÃO, I. (2014).** *Genotoxicity and DNA repair: a practical approach*. Humana Press.
- **STRYER L. (1997).** *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, p.1032–1069. *In Kuraś et al.*, 2006.
- TAHROUCH S., RAPIOR S., MONDOLOT-COSSON L., IDRISSE-HASSANI L. A., BESSIERE J. M. et ANDARY C. (2002).** *Peganum harmala*: source combinée d'aromes et de colorants. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2 (2): 33-37.
- THOMAS L. (2013).** Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4.
- UCAR K. (2002).** Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncology*, 16(9 suppl 10):163-70.
- VERDIER-PINARD P., LANSIAUX A. et BAILLY C. (2001).** Combretastatin A4 phosphate. *Bulletin du Cancer*, 88 (3): 235-239.
- VERMEERSCH M., FOUBERT K., DA LUZ R. I., PUYVELDE L. V., PIETERS L., COS, P., et MAES L. (2009).** Selective antileishmania activity of 13,28-epoxyoleanane and related triterpene saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytotherapy research*, 23:1404–10.
- VINCKEN J.-P., HENG L. DE GROOT A., et GRUPPEN H. (2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68:275–297.
- WANG Y., ZHANG Y., ZHU Z., ZHU S., LI Y., LI M., et YU, B. (2007).** Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15:2528–32.
- WILTINK W., VAN EIJK H., BOBECK-RUTSAERT M., GERBRANDY J., et LEIJNSE, B. (1972).** Urinary iron excretion in nephrotic syndrome. *Acta haematologica*, 47(5), 269-276.

[http:// www.Webencyclo.fr/home.Asp](http://www.Webencyclo.fr/home.Asp)).

<http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Colchicine>).

<http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Podophyllotoxine>).

<http://www.motherherbs.com/peganum-harmala.html>).

<https://patents.google.com/patent/EP1084126B1/fr>).

<https://www.santescience.fr/quercetine/>).

<https://www.scbt.com/scbt/fr/product/taxol-33069-62-4>).

ANNEXES

Annexe 1

Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes

1. Dosage des alcaloïdes

1.1. Fraction

L'équation de la courbe d'étalonnage : $Y=0,007X$

$$\left. \begin{array}{l} DO_F = 1,54 \\ Y = 1,154 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1,54 = 0,007X \\ \\ \end{array} \implies X = 220 \mu\text{g EC/mg.}$$

1.2. Extrait aqueux

$$\left. \begin{array}{l} DO_E = 0,199 \\ Y = 0,199 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 0,199 = 0,007X \\ \\ \end{array} \implies X = 28,42 \mu\text{g EC/mg.}$$

2. Dosage des alcaloïdes dans l'extrait aqueux

L'équation de la courbe d'étalonnage : $Y=0,017X$

$$DO_F = 0,32 = Y \implies X = 12,52 \text{ mg eq/mg.}$$

Annexe 2
L'activité antimitotique

Tableau des indices mitotiques

	Témoin négatif	Témoin positif	fraction	Lyophilisat (10mg/ml)	Lyophilisat (4mg/ml)
P	298	97	118	135	90
M	0	1	0	0	0
T	6	1	2	1	0
A	6	10	10	16	5
IM	88%	31%	37%	43%	31%
P	310	127	114	109	100
M	0	0	0	0	0
T	0	1	2	3	1
A	4	2	10	8	14
IM	90%	37%	36%	48%	35%
P	297	111	140	120	110
M	3	0	0	0	0
T	5	3	1	0	1
A	30	16	8	10	4
IM	95%	36%	42%	37%	32%
P	303	100	99	104	110
M	8	1	0	0	0
T	6	0	0	1	0
A	20	16	10	12	1
IM	96%	33%	31%	33%	31%
P	243	130	125	121	103
M	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0
A	80	6	6	11	10
IM	92%	38%	37%	37%	32%

Tableau des aberrations

Témoign positif	Fraction	Lyophilisat (10mg/ml)	Lyophilisat (4mg/ml)
IM=31% CA 3 FR 11 CS 3 DP 3 AL 4 AG 8	IM=37% DP 2 AG 30 CG 10 CB 4	IM=43% AG 24 CG 14 AL 3	IM=31% AG56 CB 6
IM = 37% AG 30 FR 3 DP 1 CP 1	IM=36% FR 3 AG 51	IM=48% CG 1 DP 5 AG 20	IM=35% AG 60 DP 3
IM = 36% CG 12 AG 8 CS 4 AL 1	IM=42% AG 30 CG 10	IM=32% CG 1 DP 5 AG 20	IM=32% AG 42 CB 6
IM= 33% AG 17 FR 10 CG 22 CS 8 CB 13	IM=31% CA 3 AG 50	IM=33% DP 5 CG 11 AG 40	IM=31% CB 6 AG 50 FR 1
IM= 38% FR 9 AG 35 AL 10	IM=37% AG 60 CG 3	IM=37% AL 10 FR 8 AG 39	IM=32% AG 50 CB 4

Tableau des indices mitotiques des différentes phases mitotiques.

échantillons	Témoign négatif	Colchicine	Fraction	Lyophilisat (4mg/ml)	Lyophilisat (10mg/ml)
IM %	92.2	35.00	36.6	32.2	40

Tableau des indices d'aberrations

Aberration	colchicine	Fraction	Lyophilisat (4mg/ml)	Lyophilisat (10mg/ml)
AG	5.6	12.62	14.74	8.17
CB	0.74	0.22	1.25	0.00
AL	0.86	0.00	0.00	0.74
PC	0	0.00	0.00	0.00
FR	1.89	0.17	0.05	0.45
DP	0.23	0.11	0.17	0.85
CG	1.94	1.31	0.00	1.5
CS	0.86	0.00	0.00	0.00
CA	0.17	0.17	0.00	0.00
AC	0	0.00	0.00	0.00
TOTAL	12.29	14.6	16.21	11.71

Tableau des indices de phases

	T-	T+	ion	Fract	Extrait aqueux (4mg/ml)	Extrait aqueux (10mg/ml)
P	85.14	27.71		33.71	38.57	25.71
M	0	0.28		0	0	0
A	1.71	0.28		0.57	0.28	0
T	1.71	2.85		2.85	4.57	1.42
P	88.57	36.28		32.57	31.14	28.57
M	0	0		0	0	0
A	0	0.28		0.57	0.85	0.28
T	1.14	0.57		2.85	2.28	4
P	84.85	31.71		40	34.28	31.42
M	0.85	0		0	0	0
A	1.42	0.85		0.28	0	0.28
T	8.57	4.57		2.28	2.85	1.14
P	86.57	28.57		28.28	29.71	31.42
M	2.28	0.28		0	0	0
A	1.71	0		0	0.28	0
T	5.71	4.57		2.85	3.42	0.28
P	69.42	37.14		35.71	34.57	29.42
M	0	0		0	0	0
A	0	0		0	0	0
T	22.85	1.71		1.71	3.14	2.85

Annexe 3

Action sur la membrane érythrocytaire

Les densités optique on été tester a deux concentrations différentes de 4 et 10 mg/ml a fin de déterminer le pourcentage d'hémolyse dans la fraction des alcaloïdes et dans les extraits aqueux, comme suite :

Fraction

A 4mg/ml (40%) :

$$DO=0.136$$

$$DO_T=1.8$$

$$\left. \begin{array}{l} 100\% \longrightarrow 1.8 \\ X \longrightarrow 0.136 \end{array} \right\} \% \text{ d'hémolyse } = 7.5\%$$

A 10mg/ml (100%)

$$DO=0.132$$

$$DO_T=1.8$$

$$\left. \begin{array}{l} 100\% \longrightarrow 1.8 \\ Y \longrightarrow 0.132 \end{array} \right\} \% \text{ d'hémolyse } = 7.3\%$$

Extrait aqueux la lecture des DO a été effectuer a deux concentrations différentes de 4 et 10 mg/ml

A 4mg/ml:

$$\text{Blanc}=0.022$$

$$DO_1=0.075$$

$$DO_2=0.062$$

$$DO_3=0.050$$

$$\left. \begin{array}{l} DO_1=0.075 \\ DO_2=0.062 \\ DO_3=0.050 \end{array} \right\} DO=0.165 \text{ avec ES} = \frac{\text{ecart type}}{\sqrt{3}}$$

$$\left. \begin{array}{l} 100\% \longrightarrow 1.8 \\ Y \longrightarrow 0.165 \end{array} \right\} \% \text{ d'hémolyse } = 10.38\%$$

A 10 mg/ml :

$$\text{Blanc } = 0.034$$

$$DO_1=0.067$$

$$DO_2=0.124$$

$$DO_3=0.076$$

$$\left. \begin{array}{l} DO_1=0.067 \\ DO_2=0.124 \\ DO_3=0.076 \end{array} \right\} DO=0.233 \text{ avec ES} = \frac{\text{ecart type}}{\sqrt{3}}$$

$$\left. \begin{array}{l} 100\% \longrightarrow 1.8 \\ Y \longrightarrow 0.233 \end{array} \right\} \% \text{ d'hémolyse } = 12,94\%$$

Annexe 4

Tableaux des testes statistiques sur STATISTICA

1) Test pour les indices mitotique

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	14516,10	1	14516,10	579,4850	0,000000
"FEQ10"	22,50	1	22,50	0,8982	0,371009
Erreur	200,40	8	25,05		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	11833,60	1	11833,60	1314,844	0,000000
"FEQ4"	48,40	1	48,40	5,378	0,048996
Erreur	72,00	8	9,00		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	12888,10	1	12888,10	687,3653	0,000000
"EQ4EQ10"	136,90	1	136,90	7,3013	0,026986
Erreur	150,00	8	18,75		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	42771,60	1	42771,60	1163,853	0,000000
T- F	7182,40	1	7182,40	195,439	0,000001
Erreur	294,00	8	36,75		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	38688,40	1	38688,40	5566,676	0,000000
T-EQ4	9000,00	1	9000,00	1294,964	0,000000
Erreur	55,60	8	6,95		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	43428,10	1	43428,10	1888,178	0,000000
T-EQ10	6916,90	1	6916,90	300,735	0,000000
Erreur	184,00	8	23,00		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	40576,90	1	40576,90	4533,732	0,000000
T+T-	8122,50	1	8122,50	907,542	0,000000
Erreur	71,60	8	8,95		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	12816,40	1	12816,40	1077,008	0,000000
T+F	6,40	1	6,40	0,538	0,484273
Erreur	95,20	8	11,90		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	13912,90	1	13912,90	642,6282	0,000000
T+EQ10	52,90	1	52,90	2,4434	0,156646
Erreur	173,20	8	21,65		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	11289,60	1	11289,60	2016,000	0,000000
T+EQ4	19,60	1	19,60	3,500	0,098282
Erreur	44,80	8	5,60		

2) Test pour les indices de phases

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	3207,323	1	3207,323	15,62801	0,000324
"Var1"	4,692	1	4,692	0,02286	0,880613
Erreur	7798,705	38	205,229		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2931,800	1	2931,800	15,56367	0,000332
EQ4 10	21,653	1	21,653	0,11495	0,736447
Erreur	7158,233	38	188,375		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	9819,76	1	9819,762	13,04253	0,000877
T-F	1991,63	1	1991,627	2,64526	0,112125
Erreur	28610,31	38	752,903		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	9333,02	1	9333,025	12,67991	0,001014
T-EQ10	2219,80	1	2219,802	3,01584	0,090557
Erreur	27969,84	38	736,048		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	10253,76	1	10253,76	13,48807	0,000736
T-EQ4	1802,98	1	1802,98	2,37168	0,131841
Erreur	28887,98	38	760,21		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	9990,02	1	9990,024	13,26825	0,000803
T-T+	1916,01	1	1916,010	2,54475	0,118946
Erreur	28611,23	38	752,927		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	3060,575	1	3060,575	15,46167	0,000345
"Var1"	0,732	1	0,732	0,00370	0,951838
Erreur	7521,949	38	197,946		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2791,573	1	2791,573	15,41526	0,000351
"Var1"	11,172	1	11,172	0,06170	0,805174
Erreur	6881,477	38	181,091		

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	3304,942	1	3304,942	16,10178	0,000272
"Var1"	1,718	1	1,718	0,00837	0,927583
Erreur	7799,621	38	205,253		

3) Test pour les indices de d'aberrations

Decomposition efficace de l'hypothese					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	128,1641	1	128,1641	5,915795	0,024522
T+F	1,0914	1	1,0914	0,050375	0,824689
Erreur	433,2945	20	21,6647		

Decomposition efficace de l'hypothese					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	101,6950	1	101,6950	6,937419	0,015914
T+EQ10	0,0368	1	0,0368	0,002512	0,960527
Erreur	293,1782	20	14,6589		

Decomposition efficace de l'hypothese					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	144,0768	1	144,0768	5,522397	0,029152
T+EQ4	2,9823	1	2,9823	0,114309	0,738814
Erreur	521,7909	20	26,0895		

Decomposition efficace de l'hypothese					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	123,8564	1	123,8564	5,452210	0,030078
"FEQ10"	1,5291	1	1,5291	0,067311	0,797944
Erreur	454,3345	20	22,7167		

Decomposition efficace de l'hypothese					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	170,2473	1	170,2473	4,985664	0,037148
"FEQ4"	0,4655	1	0,4655	0,013631	0,908222
Erreur	682,9473	20	34,1474		

Decomposition efficace de l'hypothese					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	139,5073	1	139,5073	5,139990	0,034620
"EQ4EQ10"	3,6818	1	3,6818	0,135652	0,716511
Erreur	542,8309	20	27,1415		

Résumé

L'effet antimitotique et génotoxique d'extraits aqueux et des alcaloïdes de feuilles de *Peganum harmala* L. a été évalué sur des cellules méristématiques d'apex racinaires d'*Allium cepa* L.

Un effet mitodépressif sur les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* L. a été observé avec l'extrait aqueux et la fraction des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. avec un effet subléthal de l'extrait aqueux à 4mg/ml. L'évaluation de l'activité hémolytique des extraits et de la fraction de *Peganum harmala* L. vis-à-vis des globules rouges humains par la méthode spectrophotométrique a montré que l'extrait aqueux à 10mg/ml présente un effet hémolytique plus important comparativement à l'extrait à 4mg/ml et à celui de la fraction. Les tests biologiques, réalisés in vitro, sur des érythrocytes isolés du sang humain, en présence des extraits aqueux et la fraction des alcaloïdes aux différentes concentrations, montre un effet faiblement toxique. *Peganum harmala* peut donc être utiliser à des concentrations bien étudiées, dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques car l'étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives.

Mots clés : *Peganum harmala* L., *Allium cepa*, antimitotique, hémolytique, extrait aqueux, fraction des alcaloïdes.

Abstract

The antimitotic and genotoxic effect of aqueous extracts and leaf alkaloids of *Peganum harmala* L. was evaluated on meristematic root apex cells of *Allium cepa*.

A mitotic effect on the meristematic root cells of *Allium cepa* was observed with the aqueous extract and the alkaloid fraction of the leaves of *Peganum harmala* L. with a sublethal effect of the aqueous extract at 4 mg / ml. The evaluation of the haemolytic activity of extracts and the *Peganum harmala* L. fraction against human red blood cells by the spectrophotometric method has shown that the aqueous extract at 10 mg / ml has a greater hemolytic effect compared to the extract at 4 mg / ml and that of the fraction. Biological tests, performed in vitro, on erythrocytes isolated from human blood, in the presence of aqueous extracts and the fraction of alkaloids at different concentrations, shows a weakly toxic effect. *Peganum harmala* can therefore be used at well-studied concentrations in the therapeutic and pharmacological fields because the toxicological study is an important step in order to be able to identify any undesirable effects and better identify the action sites of the active substances.

Key words: *Peganum harmala* L., *Allium cepa*, antimitotic, hemolytic, aqueous extract, alkaloid fraction