

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de master en sciences de la nature et de la vie

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Effet antimitotique et cytotoxique des alcaloïdes et des extraits
aqueux des feuilles de *Phlomis bovei* de Noé L.**

Travail réalisé par :

M^{elle} NAAB OUARDIA

M^{elle} ZAMOUM TAOUS



Devant le Jury :

Président (e) : Mme IRATNI-AICHE G. Maitre de Conférences B à l'UMMTO

Promoteur : Monsieur HOUALI K. Professeur à l'UMMTO

Co-promotrice : Madame OUZID Y. Docteur en Biochimie-Microbiologie à l'UMMTO

Examineur : Monsieur MOUALEK I. Maitre de Conférences B à l'UMMTO

Année universitaire : 2018 - 2019

Remercîments

Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidé et soutenu en particulier :

*Notre promoteur **Monsieur HOUALI K. Professeur à l'UMMTO** d'avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir accueillis dans son Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques.*

*Madame **IRATNI-AICHE G. Maitre de Conférences B à l'UMMTO** d'avoir accepté de présider la soutenance et nous la remercions pour sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse, qu'elle trouve ici notre reconnaissance et notre profond respect.*

*Madame **OUZID Y. Docteur en Biochimie-Microbiologie l'UMMTO** d'avoir accepté de nous aider dans notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.*

*Monsieur **MOUALEK I. Maitre de Conférences B à l'UMMTO** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.



Dédicace

Merci à ma famille pour son soutien et en particulier mes très chers parents pour leurs conseils et leurs encouragements durant toutes mes études. Ce travail est le fruit de tous vos sacrifices, que Dieux vous garde longtemps près de nous.

A mes chères sœurs Anaïs et Samira.

A mes amis (es).

A mon binôme.

A tous ceux qui nous ont aidé pour réaliser ce travail de près ou de loin.

A toute la promotion Biochimie Appliquée 2018-2019.

« Rien n'est près, rien n'est loin, tout est une question de volonté » Jérôme Treffel.

OUARDIA



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.

A mes chers frères pour leur appui et leurs encouragements.

A la mémoire de mes grands-parents et mes deux frères, que Dieu les accueille dans son vaste Paradis.

A tous mes ami(e)s sans exception.

A tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagné et soutenu durant ces années de formation.

Merci d'être toujours là pour moi.

« En vérité, le chemin peu importe, la volonté d'arriver suffit à tout »

Albert Camus.

TAOUS

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert.

ATP : Adénosine triphosphate.

G1 : Gap 1 (intervalle 1).

G2 : Gap 2 (intervalle 2).

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Feuilles et fleurs de <i>Phlomis bovei</i> de Noé | 2 |
| Figure 2 : Principaux cycles azotés des alcaloïdes | 5 |
| Figure 3 : Structure des différents types d'alcaloïdes | 6 |
| Figure 4 : Structure de base d'un flavonoïde | 9 |
| Figure 5 : Différentes phases de la mitose | 14 |
| Figure 6 : Principaux sites d'action des antimittotiques | 15 |
| Figure 7 : Structure chimique de la colchicine | 16 |
| Figure 8 : Structures chimiques des alcaloïdes de <i>Vinca</i> | 16 |
| Figure 9 : Structure chimique de la podophyllotoxine | 17 |
| Figure 10 : Structures des taxanes | 18 |
| Figure 11 : Structure de la membrane du globule rouge | 19 |
| Figure 12 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux..... | 24 |
| Figure 13 : Etapes de l'évaluation de l'effet antimittotique | 27 |
| Figure 14 : Etapes de préparation de la suspension des globules rouges | 29 |
| Figure 15 : Histogramme des moyennes des indices mitotiques de la fraction alcaloïdes et des extraits aqueux testés..... | 31 |
| Figure 16 : Différentes phases de la mitose observées au niveau des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> visualisées sous microscope optique (X400) | 32 |
| Figure 17 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>Allium cepa</i> traitées par la colchicine, visualisées sous microscope optique (X400) | 37 |

| | |
|--|-----------|
| Figure 18 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>Allium cepa</i> traitées avec la fraction d'alcaloïdes, visualisées sous microscope optique (X400)..... | 38 |
| Figure 19 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>Allium cepa</i> traitées avec l'extrait aqueux à 4mg/ml, visualisées sous microscope optique (X400)..... | 38 |
| Figure 20 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>Allium cepa</i> traitées avec l'extrait aqueux à 10mg/ml, visualisées sous microscope optique (X400)..... | 39 |
| Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la colchicine..... | 42 |
| Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la quercétine | 43 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----------|
| Tableau I : Classification botanique de <i>Phlomis bovei</i> de Noé..... | 3 |
| Tableau II : Différents groupes d'alcaloïdes..... | 7 |
| Tableau III : Structures et exemples des composés phénoliques simples | 9 |
| Tableau IV : Structures de base des principaux flavonoïdes. | 10 |
| Tableau V : Structure et rôle de quelques alcaloïdes. | 11 |
| Tableau VI : Classes, structures et utilisations des terpénoïdes | 12 |
| Tableau VII : Solvants et réactifs utilisés | 22 |
| Tableau VIII : Indices de phase des témoins, de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux testés | 35 |
| Tableau IX : Indices d'aberrations de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux testés | 37 |
| Tableau X : Valeurs limites de cytotoxicité de la colchicine, de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux testés..... | 41 |
| Tableau XI : Taux d'hémolyse provoqué par la fraction et les extraits aqueux | 44 |

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Première partie : Synthèse bibliographique.

I. Etude bibliographique sur *Phlomis bovei* de Noé..... 2

1.1. Présentation de l'espèce *Phlomis bovei* de Noé 2

1.2. Usages traditionnels et effets biologiques 3

1.3. Etude phytochimique..... 4

1.3.1. Alcaloïdes 4

1.3.1.1. Définition 4

1.3.1.2. Biosynthèse 5

1.3.1.3. Classification 6

1.3.1.3.1. Selon l'origine biosynthétique 6

1.3.1.3.2. Selon leur composition chimique et structure moléculaire 6

1.3.1.4. Propriétés pharmacologiques et applications 7

1.3.1.5. Propriétés physico-chimiques 7

1.3.2. Composés phénoliques 8

1.3.2.1. Composés phénoliques simples..... 8

1.3.2.2. Composés phénoliques complexes..... 9

1.3.2.2.1. Flavonoïdes 9

| | |
|---|-----------|
| 1.3.2.2.2. Tanins | 10 |
| 1.3.2.2.3. Terpénoïdes | 11 |
| II. Cycle cellulaire et les agents antimittotiques | 12 |
| 2.2. Cycle cellulaire | 12 |
| 2.2.1. L'interphase..... | 13 |
| 2.2.2. La phase M ou mitose | 13 |
| 2.2.3. Agents antimittotiques | 14 |
| 2.2.3.1. Les inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules..... | 15 |
| III. Le globule rouge et la membrane érythrocytaire | 18 |
| 3.1. Définition du globule rouge | 18 |
| 3.1.1. La membrane érythrocytaire | 19 |
| 3.2. Hémolyse..... | 19 |

Deuxième partie : Partie expérimentale

| | |
|---|-----------|
| 1. Matériel et méthodes | 21 |
| 1.1. Matériel | 21 |
| 1.1.1. Matériel biologique | 21 |
| 1.1.2. Solvants et réactifs | 21 |
| 1.1.3. Matériel de laboratoire | 23 |
| 1.2. Méthodes | 23 |
| 1.2.1. Extraction des alcaloïdes totaux | 23 |
| 1.2.2. Extraction aqueuse | 25 |
| 1.2.3. Dosages | 25 |
| 1.2.3.1. Dosage des alcaloïdes..... | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.3.2. Dosage des flavonoïdes | 25 |
| 1.2.4. Activité biologique | 26 |
| 1.2.4.1. Activité antimittotique..... | 26 |
| 1.2.4.2. Effets de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux sur l'intégrité membranaire érythrocytaire | 28 |
| 1.2.4.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire | 28 |
| 1.2.4.2.2. Mesure du taux d'hémolyse | 29 |
| 1.1.5. Analyse statistique..... | 30 |
| II. Résultats et discussion..... | 31 |
| 2.1. Activité antimittotique | 31 |
| 2.1.1. Indices mitotiques | 31 |
| 2.1.2. Indices de phases | 33 |
| 2.1.3. Indices d'aberrations et anomalies | 35 |
| 2.1.4. Valeur limite de cytotoxicité | 40 |
| 2.2. Dosages | 41 |
| 2.2.1. Dosage des alcaloïdes..... | 41 |
| 2.2.2. Dosage des flavonoïdes..... | 42 |
| 3.3. Effets de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire | 43 |
| Conclusion et perspectives..... | 46 |

Références bibliographiques

Annexes

ملخص/Abstract/Résumé

A decorative vertical bar on the left side of the page, composed of a light blue outer border and a light pink inner border. To the right of this bar, several thin, curved lines in various colors (green, red, yellow, black, grey) extend upwards and outwards from the bottom left corner, creating an abstract, organic shape.

Introduction

Depuis longtemps, les plantes ont été une source d'inspiration pour les nouveaux composés médicamenteux. Presque toutes les civilisations et les cultures de l'antiquité ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, accessibilité, disponibilité et faible toxicité qui est liée à la dose (KOUDALY *et al.*, 2014). Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la phytothérapie pour des soins de santé primaires.

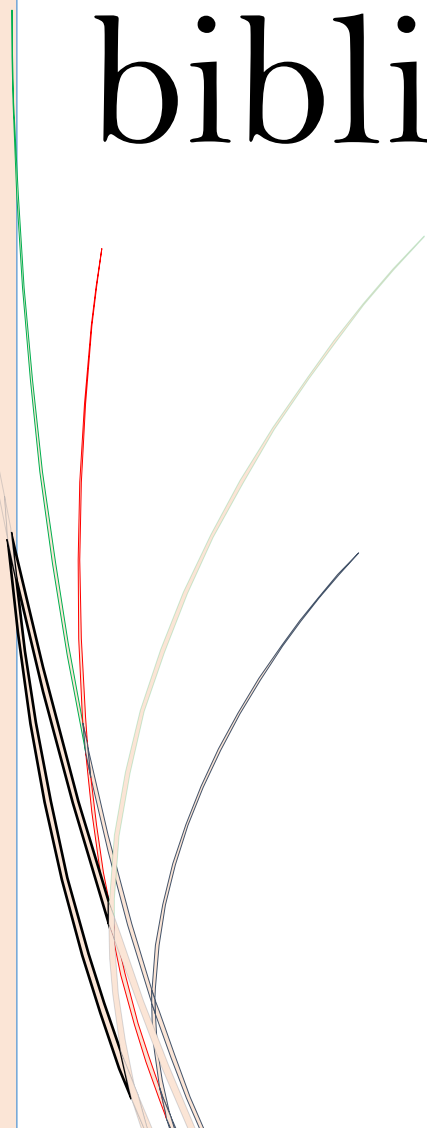
Actuellement, les laboratoires de biologie et de chimie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout des pathologies diverses, notamment le cancer qui est l'une des maladies incurables constituant la cause majeure de décès dans le monde (ANTOINE, 2005). Ceci par la recherche de nouveaux traitements anticancéreux ciblés qui représentent une alternative pour la chimiothérapie.

Phlomis bovei de Noé L. est une plante endémique appartenant à la famille des Lamiacées. C'est l'une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et très utilisée par les thérapeutes traditionnels. Les espèces de cette famille sont réputées actives grâce aux composés bioactifs qu'elles refferment (KECHAR *et al.*, 2016). Il s'agit essentiellement de métabolites secondaires de diverses formes chimiques pour lesquels plusieurs effets thérapeutiques ont été attribués. En raison de la diversité des composés secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes...) contenus dans ces espèces, des études d'activités biologiques ont été menées dans un large éventail de domaines différents.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail structuré en deux parties :

- Une synthèse bibliographique mettant l'accent sur la description botanique et phytochimique de la plante étudiée et de ses utilisations en médecine traditionnelle. Un rappel sur le cycle cellulaire et les différentes classes d'agents antimittotiques. Dans un dernier temps, elle décrit le globule rouge et le phénomène de l'hémolyse ;
- Une étude expérimentale incluant l'évaluation de l'activité antimittotique de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* à différentes concentrations (4mg/ml et 10mg/ml), ainsi que leurs effets sur l'intégrité membranaire érythrocytaire.

Partie bibliographique



I. Etude bibliographique sur *Phlomis bovei* de Noé

1.1. Présentation de l'espèce *Phlomis bovei* de Noé

Le nom *Phlomis*, herbe au vent, vient du grec « *phlose* » qui signifie flamme car les feuilles servaient à faire des mèches de lampe (BELOUED, 1935). Le genre *Phlomis*, herbe vivace, comprend 12 espèces en Asie et en Europe et plus de 100 espèces distribuées en Afrique (KATAYOUN *et al.*, 2004). En Algérie, il existe quatre espèces : *Phlomis herba-venti* et trois espèces endémiques : *Phlomis bovei*, *P. caballeroi* et *P. crinita* (QUEZEL et SANTA, 1963).

Phlomis bovei de Noé *L.* est une espèce très importante de la famille des Lamiacées. Elle est connue sous le nom de « *Phlomis samia* », en arabe « *khayatt el adjarah* » et en kabyle sous celui de « *iles t-funast* ». C'est une plante vivace à tige rameuse pouvant atteindre un mètre, à feuilles cordées à la base, denticulées et pétiolées. Elle est caractérisée par des fleurs roses à lèvres supérieures recourbées et grandes, d'un calice tubuleux, strié et muni de cinq dents courtes et aigues, à bractée linéaire presque aussi longue que le calice (BABA AISSA, 1999) (Figure 1).



Figure 1 : Feuilles (BENSIDHOUM, 2019) et fleurs (ZAABAT, 2010) de *Phlomis bovei* de Noé *L.*

C'est une espèce rare, méditerranéenne, commune dans toute l'Algérie septentrionale. Elle est protégée par le décret exécutif N° 12-03 (fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées). La classification systématique de *Phlomis bovei* de Noé *L.* est représentée dans le tableau I.

Tableau I : Classification botanique de *Phlomis bovei de Noé L.* (GUINGNARD,1998).

| Rang taxonomique | Nomenclature |
|--------------------|--------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Spermaphyte |
| Sous-Embranchement | Angiosperme |
| Classe | Dicotylédone |
| Sous-Classe | Asteridae |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiacées |
| Sous-Famille | Lamoideae |
| Genre | Phlomis L. |
| Espèce | <i>Phlomis bovei de Noé L.</i> |

1.2. Usages traditionnels et effets biologiques

La plante entière de *Phlomis bovei de Noé L.* est utilisée dans la région méditerranéenne en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire et antioxydant. En Algérie elle est utilisée en tant que colle cicatrisante pour traiter les brûlures, lésions, infections de peau et allergies (LIOLIOS *et al.*, 2007). En Chine, elle est utilisée comme analgésique. Au Tibet, les racines sont utilisées pour traiter les rhumes et les fièvres. Un certain nombre d'espèces du genre *Phlomis* est utilisé comme stimulants, antalgiques, antidiabétiques, antipyrétiques, anti diarrhéiques, antiallergiques et anti-hémorroïdaires. Quelques études pharmacologiques et biologiques ont montré d'autres activités notamment l'activité immunosuppressive, antimutagène et antimicrobienne (ABEDINI, 2013).

1.3. Etude phytochimique

Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme, on distingue deux classes : métabolites primaires et métabolites secondaires.

- **Les métabolites primaires** : sont caractérisés par leurs propriétés nécessaires et vitales. Ils sont divisés en trois groupes : les glucides, les lipides et les protéines (KONE, 2009 ; BADIAGA, 2012).
- **Les métabolites secondaires** : n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de la plante (GUIGNARD, 1996). Ce sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (BOUDJOUREF, 2011). Ils sont présents en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire (PEEKING *et al.*, 1987). En 1987 plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus.

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, ils résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de shikimate, la voie de mévalonate et la voie du pyruvate (VERPOORTE et ALFERMANN, 2000). La plupart des précurseurs sont issus de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate et du métabolisme des lipides. Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité structurale observée au niveau des métabolites secondaires (MAYER, 2004). Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques.

1.3.1. Alcaloïdes

Il y a au moins 3000 ans que MAKIND a signalé l'existence des alcaloïdes dans les potions, les thés et les poisons. Ce n'est qu'au début du XIX^e siècle que le terme d'alcaloïde a été introduit par W. MEISNER pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Ce terme est dérivé de l'arabe « *al kaly* » qui signifie la soude et du grec « *eidos* » qui signifie l'aspect (BRUNETON, 1999).

1.3.1.1. Définition

Les alcaloïdes sont des substances organiques le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques et douées à faible dose de propriétés physiologiques marquées (ZENK et JUENGER, 2007). Ils portent tous la terminaison « *ine* » (PARIS et HURABIELLE, 1981) sauf la comptothecin (PELLETIER, 1983).

Les alcaloïdes existent rarement dans la plante à l'état libre. Le plus souvent, ils se trouvent en mélange de constitution plus ou moins apparentée ou l'un d'entre eux domine. Ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tartrates, malates...) ou combinés à des tanins (GUIGNARD *et al.*, 1985). Ils peuvent être présents dans tous les organes (ZIEGLER et FACCHINI, 2008). Leur teneur est très variable, généralement elle est comprise entre 0.1 % et 2 à 3% du poids sec de la drogue (ROUX et CATIER, 2007). Parfois, on trouve des teneurs supérieures à 10 % (PARIS et HURABIELLE, 1981).

1.3.1.2. Biosynthèse

Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (ZIEGLER et FACCHINI, 2008). Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme primaire (NACOUJMA, 2012).

Les principaux cycles azotés des alcaloïdes sont regroupés dans la figure 2 ci-dessous :

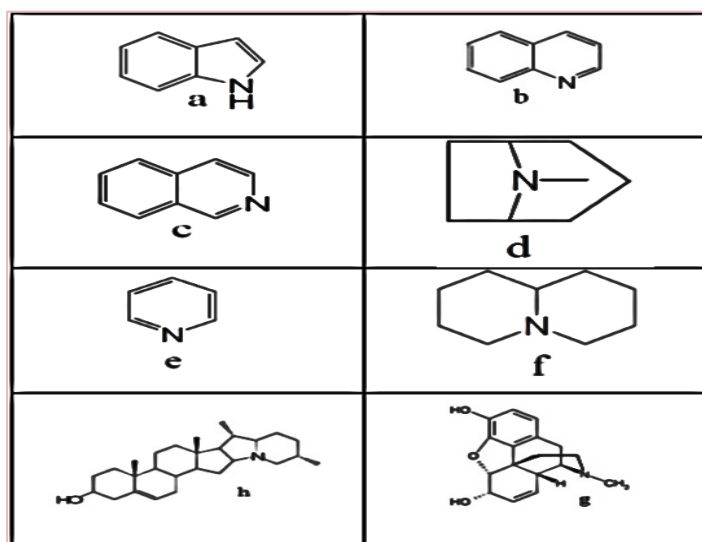


Figure 2 : Principaux cycles azotés des alcaloïdes (MEDJROUBI *et al.*, 1997).

Indole (a) ; quinoléine (b) ; isoquinoline (c) ; tropane (d) ; pyridine (e) ; quinolizidine (f) ; morphine (g) ; solanidine (h).

1.3.1.3. Classification

1.3.1.3.1. Selon l'origine biosynthétique

On distingue trois types d'alcaloïdes :

- **Les alcaloïdes vrais**, qui sont bio synthétiquement formés à partir d'un acide aminé (BRUNETON, 1999). Ils présentent en moins un hétérocycle. C'est le groupe majoritaire des alcaloïdes, (Nicotine du tabac, figure 3(a)).
- **Les proto-alcaloïdes**, qui ont une structure proche des amines (GUIGNARD, 2000), ils ne possèdent pas un azote intra-cyclique. Ils sont élaborés *in vivo* à partir des acides aminés (BRUNETON, 1999), (Mescaline de peyotl, figure 3 (b)).
- **Les pseudo-alcaloïdes**, qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (BRUNETON, 1999), (Coniine de la ciguë, figure 3 (c)).

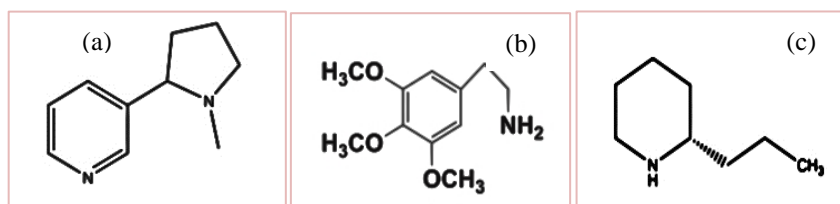


Figure 3 : Structure des différents types d'alcaloïdes (DJABER, 2017)

Nicotine (a) ; Mescaline (b) ; Coniine (c).

1.3.1.3.2. Selon leur composition chimique et structure moléculaire

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes selon leur composition chimique et structure moléculaire (Tableau II).

Tableau II : Différents groupes d'alcaloïdes (GONZALEZ *et al.*, 1984 ; DONATIEN, 2008).

| Groupe | Nom | Plante |
|---------------------------------------|--|----------------|
| Phénylalanine | Colchicine | Colchique |
| Alcaloïde isoquinoléiques | Morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine | Opium du pavot |
| Alcaloïdes indoliques | Ergométrine, ergotamine et ergotoxine de l'ergot | Céréale |
| Alcaloïdes quinoléiques | - | Cinchona |
| Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques | Ricinine | Ricin |
| Alcaloïdes dérivés du tropane | Scopolamine et atropine | Belladone |
| Alcaloïdes stéroïdes | Aconitine | Aconite |

1.3.1.4. Propriétés pharmacologiques et applications

Actuellement, les alcaloïdes présentent de nombreuses applications en médecine moderne, en raison de leurs propriétés pharmacologiques. Certaines substances peuvent ainsi être analgésiques (morphine), antipaludiques (quinine), anticancéreuses (vinblastine, vincristine), tandis que d'autres se révèlent toxiques (strychnine, nicotine). Les alcaloïdes jouent aussi le rôle d'antibiotiques comme la clausenol et la squalamine. Compte tenu de cet éventail de propriétés, les plantes à alcaloïdes et les alcaloïdes occupent une place de choix dans les pharmacopées tant traditionnelles que modernes (JABER, 2017).

1.3.1.5. Propriétés physico-chimiques

Généralement les alcaloïdes possèdent de faibles masses molaires (rarement > 1000 Da). La majorité sont des solides cristallisés, une minorité sont liquides à température ambiante. En outre, en raison de la présence de carbones asymétriques, la plupart d'entre eux sont souvent sous forme d'énantiomères purs et caractérisés par un pouvoir rotatoire. Leur basicité est très variable et dépend de la disponibilité des doublets libres des atomes d'azote existants (JABER,

2017). La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques (WICHTL et ANTON, 2009).

1.3.2. Composés phénoliques

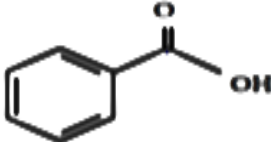
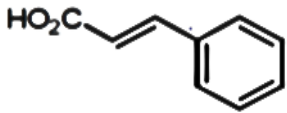
Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction (éther, ester...) (BRUNETON, 1999). Ils forment une grande famille de composés chimiques depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux polymères complexes qui sont les flavonoïdes et tanins (HOPKINS, 2003 ; HURABIELLE, 1981). La grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie de shikimate (GORHAM, 1977).

La classification de ces substances a été proposée par HARBORNE (1980). On peut distinguer les différentes classes des composés phénoliques en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base (MACHEIX *et al.*, 2006). Les principales classes les plus répandues sont les suivantes :

1.3.2.1. Composés phénoliques simples

Ils regroupent deux classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (MACHEIX *et al.*, 2006) (Tableau III).

Tableau III : Structures et exemples de composés phénoliques simples (GORHAM, 1977 ; HASLAM, 1994 ; BRUNETON, 1999 ; PAWLOWSKA *et al.*, 2006).

| Composé | Structure | Exemple |
|--|--|---|
| Acide phénols dérivés d'acide benzoïque | <p>Appelés également des hydroxybenzoïques. Ils peuvent être à l'état libre, estérifiés ou glycosylés.</p>  <p>Acide benzoïque.</p> | <p>Acide salicylique. Acide gallique.</p> |
| Acide phénols dérivés d'acide cinnamique | <p>Appelés aussi acides hydroxycinnamiques. Ils sont souvent estérifiés.</p>  <p>Acide cinnamique.</p> | <p>Acide caféique Acide férulique</p> |

1.3.2.2. Composés phénoliques complexes

1.3.2.2.1. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques, ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (BENHAMMOU, 2011). Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (Cycle C) (Figure 4) (AKROUM, 2011).

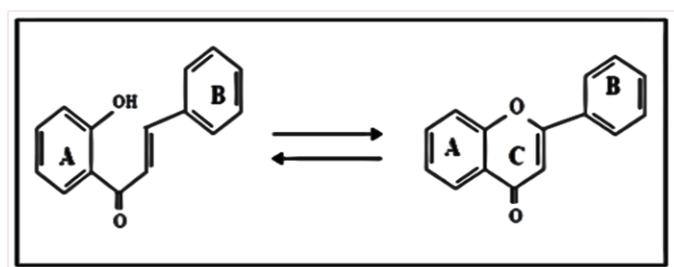
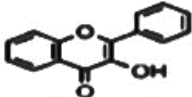

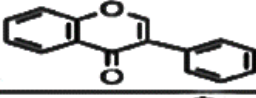
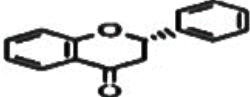
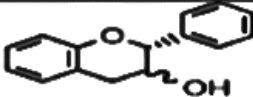
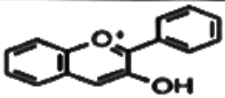


Figure 4 : Structure de base d'un flavonoïde (HELLER et FORKMANN, 1993).

Les structures de base des principaux flavonoïdes sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Structures de base des principaux flavonoïdes (HARBORNE et WILLIAMS, 2000).

| | Structure |
|--------------------|--|
| Flavonoles |  |
| Flavones |  |
| Isoflavones |  |
| Flavanones |  |
| Flavan-3-ol |  |
| Anthocyanes |  |

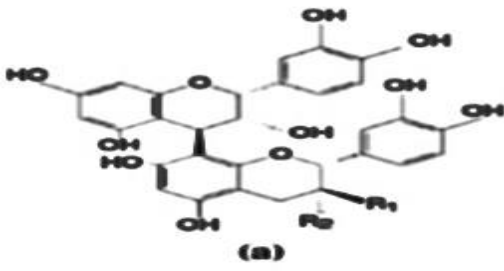
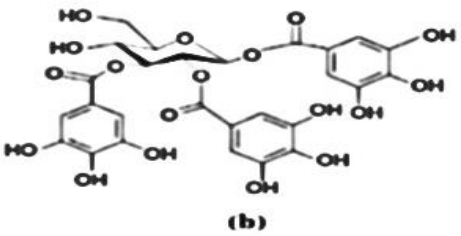
Les flavonoïdes sont généralement des antibactériens (WICHTL et ANTON, 2009) comme certains d'entre eux ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (ISERIN *et al.*, 2001).

1.3.2.2.2. Tanins

Le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines, d'où leur capacité à tanner le cuir (RODRIGUES, 2008). En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction de leur structure et

de leur origine biogénétique, en tanins hydrolysables et en tanins condensés. Leurs structures ainsi que leurs rôles sont indiqués dans le tableau V.

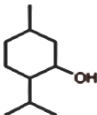
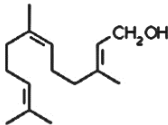
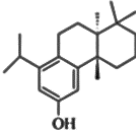
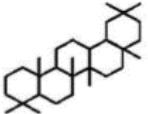
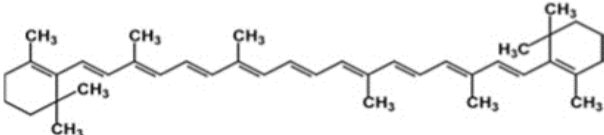
Tableau V : Structure et rôle de quelques tanins (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; ISERIN *et al.*, 2001 ; LAMY *et al.*, 2014).

| Composé | Structure chimique | Rôle |
|---------------------------------------|--|---|
| Tanin condensé (Proanthocyanidine) |  | Activité antioxydante, antifongique, antitumorale et antivirale. |
| Tanin hydrolysable (Gallotanin) |  | Retendre les tissus souples ; réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure ; faciliter le transit intestinal. |

1.3.2.2.3. Terpénoïdes

Appelés aussi terpènes, constituent un vaste groupe de métabolites secondaires. Ce sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte (HELLAL, 2011). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (HERNANDEZ-OCHOA, 2005). Leurs classes, structures ainsi que leurs utilisations sont représentées dans le tableau VI.

Tableau VI : Classes, structures et utilisations des terpénoïdes (GUIGNARD, 1996 ; GRAVOT, 2009 ; COULERIE, 2012 ; BETINA-BENCHARIF, 2014).

| Composé | Structure | Utilisations |
|-------------------------|---|---|
| Monoterpènes (C10) | Menthol  | Certains d'entre eux peuvent être utilisés comme anti-inflammatoires, antitumoraux et antiviraux. Leurs applications s'étendent même jusqu'à leur utilisation en tant que produits cosmétiques, de fragrances en parfumerie, de saveurs, d'additifs alimentaires et même d'insecticides (artémisinine est un anti-malaria). |
| Sesquiterpènes (C15) | Farnésol  | |
| Diterpènes (C20) | Totarol  | |
| Triterpènes (C30) | Oléanane  | |
| Tétraterpènes (C40) | Bêta-carotène  | |

II. Cycle cellulaire et les agents antimittotiques

2.2. Cycle cellulaire

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 elle finit 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.

2.2.1. L'interphase

Elle 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).

- **La phase G1** : 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 (synthèse)** : correspond à la réplication de l'ADN.
- **La phase G2** : cette phase prépare la mitose, elle est caractérisée par la synthèse des protéines motrices de la condensation des chromosomes.

2.2.2. La phase M ou mitose

Du Grec *mi* : en deux ; *tom* : coupure : ce processus de division cellulaire comprend, une division nucléaire (caryocinèse) et une division cytoplasmique (cytodiérèse).

La caryocinèse comprend cinq phases (figure 5) : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Elle est produite grâce au fuseau mitotique constitué de microtubules (ALBERTS *et al.*, 1997). Un microtubule est un cylindre creux de 24 nm de diamètre dont la paroi est constituée de 13 protofilaments, chacun d'eux est une succession d'hétérodimères alpha/bêta tubuline.

Les différentes phases de la mitose sont les suivantes :

- **la prophase** : il s'agit de l'étape pendant laquelle les chromosomes se condensent sous forme de 2 brins appelés chromatides. Il y a également formation du centrosome sur lequel se fixent les microtubules (COLOMBEL, 2009).
- **la prométaphase** : correspond à la résorption de l'enveloppe nucléaire et à la fixation aléatoire des chromosomes aux microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique.
- **la métaphase** : durant cette phase, l'enveloppe nucléaire disparaît. Les chromosomes se retrouvent dans le cytoplasme. Ils se lient aux microtubules par une protéine appelée kinétochore puis s'alignent sur le plan équatorial de la cellule (COLOMBEL, 2009).

- **l'anaphase** : c'est à ce moment que les deux chromatides se séparent et migrent chacune vers un pôle de la cellule à l'aide des microtubules kinétochoriens qui rétrécissent tandis que les microtubules polaires s'étirent donnant une forme allongée à la cellule (COLOMBEL, 2009).
- **la télophase** : les microtubules kinétochoriens disparaissent. Deux enveloppes nucléaires se forment autour des chromosomes fils. Les autres microtubules s'allongent jusqu'à la formation de deux cellules filles (COLOMBEL, 2009).

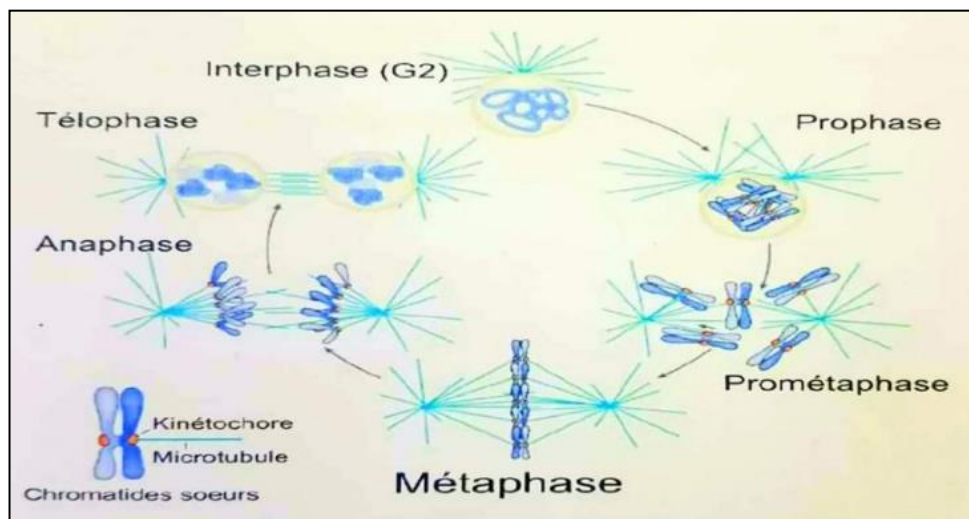


Figure 5 : Différentes phases de la mitose (CHEESEMAN et DESAI, 2008).

La cytotélerèse : 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 (MABUCHI, 1986).

2.2.3. Agents antimitotiques

Les agents antimitotiques sont soit des substances, soit des radiations qui, à 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 sa préparation et ainsi d'empêcher la cellule d'entrer en cinèse (division) (CHEVREMONT, 1979). Selon leurs modes d'actions ces substances chimiques de structure et d'origine variées sont capables d'exercer une action antimitotique spécifique soit sur (CHEVREMONT, 1979) :

- l'ADN : par action des agents alkylants et des agents scindants ;

- les enzymes : par action des antimétabolites et des antitopoisomérases ;
- les microtubules : par action des poisons du fuseau mitotique (Figure 6).

La plupart de ces substances exercent leur action durant le cycle cellulaire soit à une phase spécifique du cycle, elles sont dites « agents phases dépendants » ; soit tout au long du cycle, elles sont dites « agents cycle dépendants » (GORIN *et al.*, 1996).

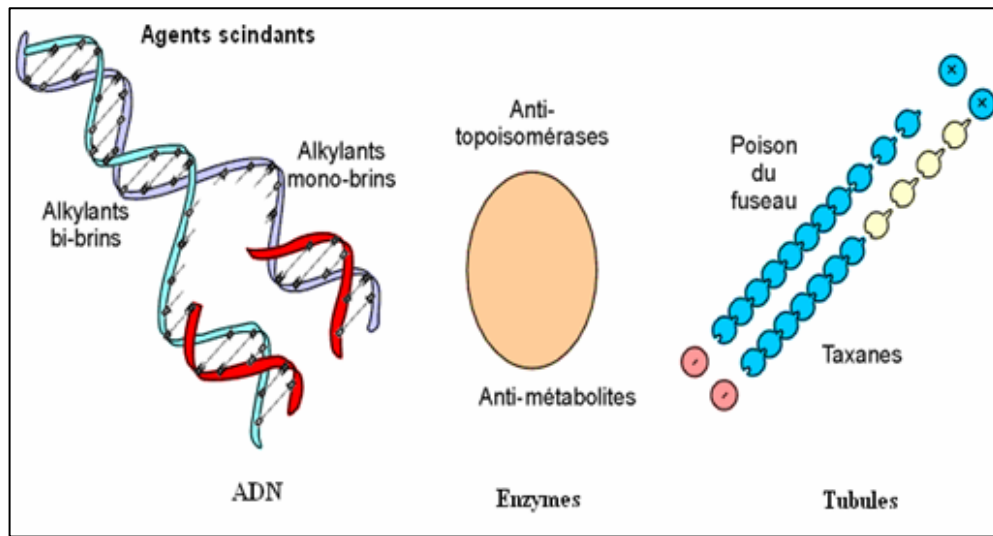


Figure 6 : Principaux sites d'action des antimétabolites (ANONYME 1).

2.2.3.1. Les inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules

➤ La colchicine

La colchicine est le premier alcaloïde à avoir été identifié en 1820 par PELLETIER et CAVENTOU. C'est un composé antimétabolite naturel, de formule brute $C_{22}H_{25}NO_6$, caractérisé par une structure tricyclique benzo-cyclohéptanotropolonique (Figure 7). Cette molécule est extraite principalement de deux plantes de la famille des Liliacées : *Gloriosa superba* et *Colchicum autumnale*. En se fixant sur une molécule de la tubuline, la colchicine empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance des microtubules entraîne le blocage de la division cellulaire au stade métaphase, l'inhibition de la motilité cellulaire et le transport intracellulaire des vésicules et des organites (GARRETT et GRISHAM, 2000).

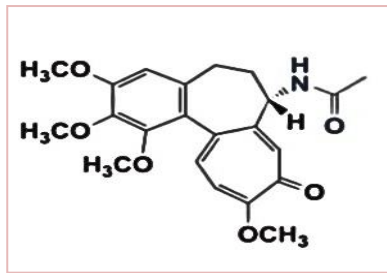


Figure 7 : Structure chimique de la colchicine (ALLAIN, 2005).

➤ **Les vinca-alcaloïdes**

Catharanthus roseus dite la pervenche de Madagascar, fait partie de la famille des Apocynaceae (GUERITTE et FAHY, 2005). Cette plante produit deux molécules bioactives qui appartiennent à la famille des alcaloïdes : la vinblastine et la vincristine. Par ailleurs, il est possible d'obtenir deux autres principes actifs par hémisynthèse de ces deux molécules : la vindésine et la vinorelbine (Figure 8).

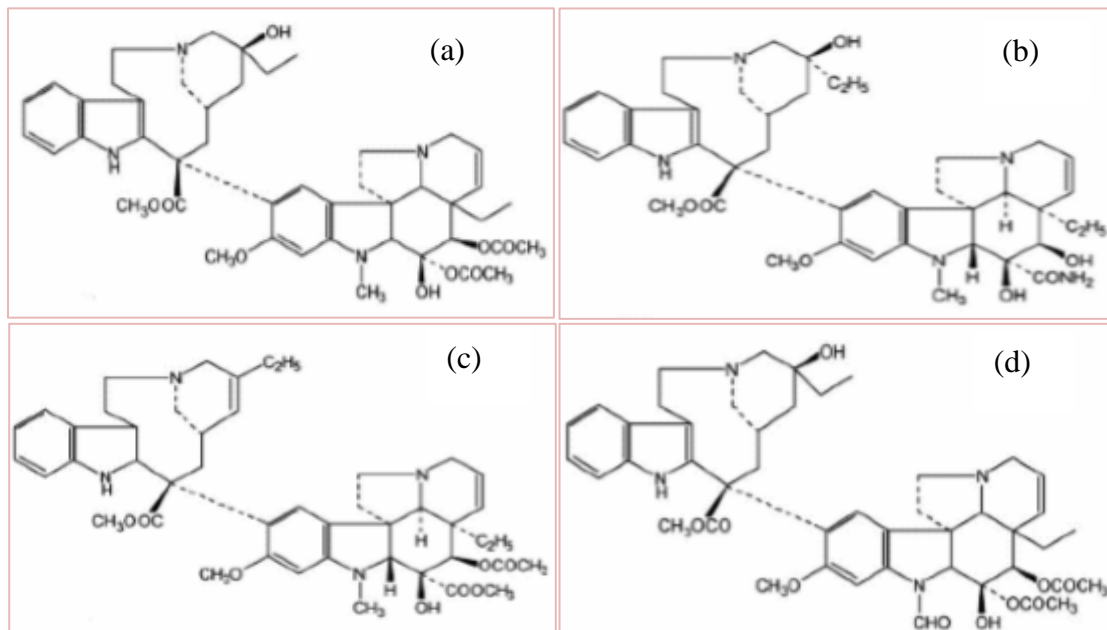


Figure 8 : Structures chimiques des alcaloïdes de Vinca (HAIT *et al.*, 2006).

(a) vincristine ; (b) vinblastine ; (c) vinorelbine ; (d) vindesine.

Les vinca-alcaloïdes exercent leur activité après liaison à la tubuline, cette protéine

ubiquitaire (omniprésente) existe sous deux formes en équilibre : dimère et polymère constitutif de l'appareil microtubulaire. Ces substances ont une affinité pour la forme dimérique, après liaison avec celle-ci, elles inhibent la formation des microtubules (la forme polymérique) et interfèrent donc avec ses principales fonctions qui est la formation du fuseau mitotique et l'établissement du cytosquelette (EPSIE *et al.*, 1998). Ceci conduit à un blocage de la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau et la dispersion des chromosomes au hasard à travers le cytoplasme (GORIN *et al.*, 1996).

➤ Les podophyllotoxines

La podophyllotoxine est extraite de *Podophyllum peltatum L.* qui fait partie de la famille des Podophyllaceae (LEE et XIAO, 2005). L'effet inhibiteur est dû à sa fixation à la tubuline qui se traduit par la modification de la structure de cette protéine en la rendant impropre à la formation de microtubules (Figure 9). La podophyllotoxine inhibe non seulement certaines fonctions des microtubules, mais en partie également la synthèse de l'ADN par réduction du transport intracellulaire des nucléosides.

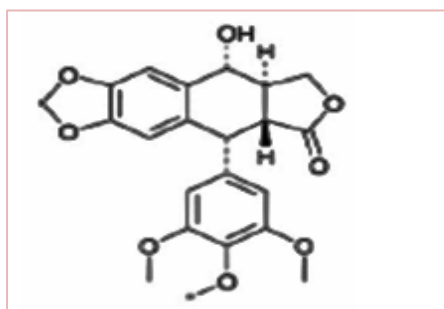


Figure 9 : Structure chimique de la podophyllotoxine (HAIT *et al.*, 2006).

➤ Taxol

Le taxol est extrait du *Taxus baccata L.* qui appartient à la famille des Taxaceae (HARTWELL, 1982). Parmi ces dérivés on distingue les taxoïdes (ou taxanes) qui correspondent aux docétaxel et paclitaxel (Figure 10). Ces composés sont des diterpènes générés par hémisynthèse à partir des précurseurs contenus dans les feuilles d'if (EPSIE *et al.*, 1998). 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 du fuseau mitotique (EPSIE *et al.*, 1998).

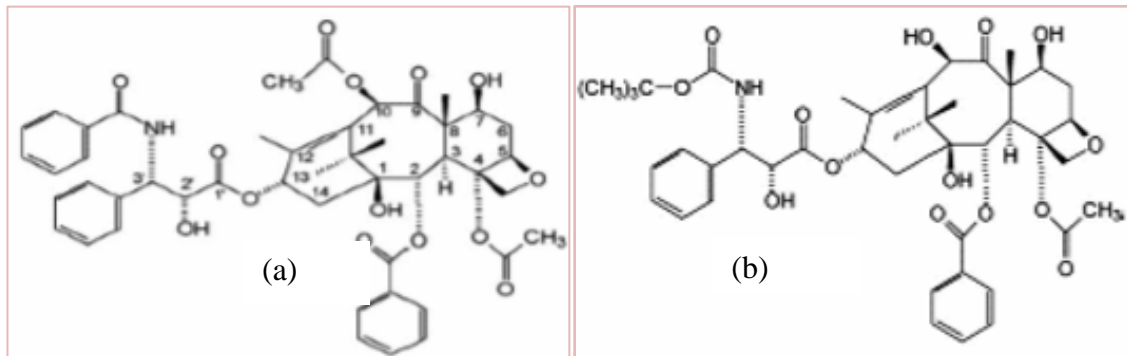


Figure 10 : Structures des taxanes (HAIT *et al.*, 2006). (a) Paclitaxel ; (b) Docétaxel.

Il existe d'autres drogues d'origine marine et microbienne qui ont pour cible les microtubules. On rencontre par exemple :

- les dolastatines : extraites du lièvre marin *Dolabella auricularia*. Ce sont des inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules et aussi des inhibiteurs compétitifs des vincalcaloïdes *in vitro* (BAI *et al.*, 1990) ;
- l'épothilone A et B : ce sont des macrolides, ils induisent la polymérisation de la tubuline *in vitro* en microtubules et l'arrêt du cycle cellulaire (BOLLAG *et al.*, 1995). Ce sont des inhibiteurs compétitifs de paclitaxel (KOWALSKI *et al.*, 1997).

III. Le globule rouge et la membrane érythrocytaire

3.1. Définition du globule rouge

Les globules rouges, hématies ou érythrocytes sont les cellules les plus abondantes de la circulation sanguine. Leur production quotidienne est de 200×10^9 , et leur durée de vie est de 120 jours, au cours desquels ils effectuent un déplacement de près de 500 km dans la microcirculation. Ils ont pour fonction de transporter l'oxygène (O_2) des poumons vers les tissus, et d'évacuer le dioxyde de carbone (CO_2) en sens inverse. (GUILAUM, 2007). La particularité des globules rouges est l'absence de noyau et ceci implique deux notions :

- absence d'ADN ou d'ARN (incapacité de synthèse protéique) ;
- un stock enzymatique et énergétique limité et prédéterminé (ELALAOUI, 2014).

Leur forme discoïde favorise l'ancrage du cytosquelette, l'organisation des lipides et les échanges avec le milieu externe.

3.1.1. La membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère un nombre important de protéines reliées au cytosquelette sous membranaire, 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 également un rôle dans la stabilité et l'ancrage des hématies au niveau du cytosquelette cellulaire grâce à : la protéine bande 3, la glycophorine A et C qui forment des interactions avec les protéines intrinsèques (ELGSAETER *et al.*, 1986).

- La protéine 3 se fixe à la β spectrine grâce à l'ankyrine.
- Les glycophorines A et C se fixent à la protéine 4.1. (Figure 11).

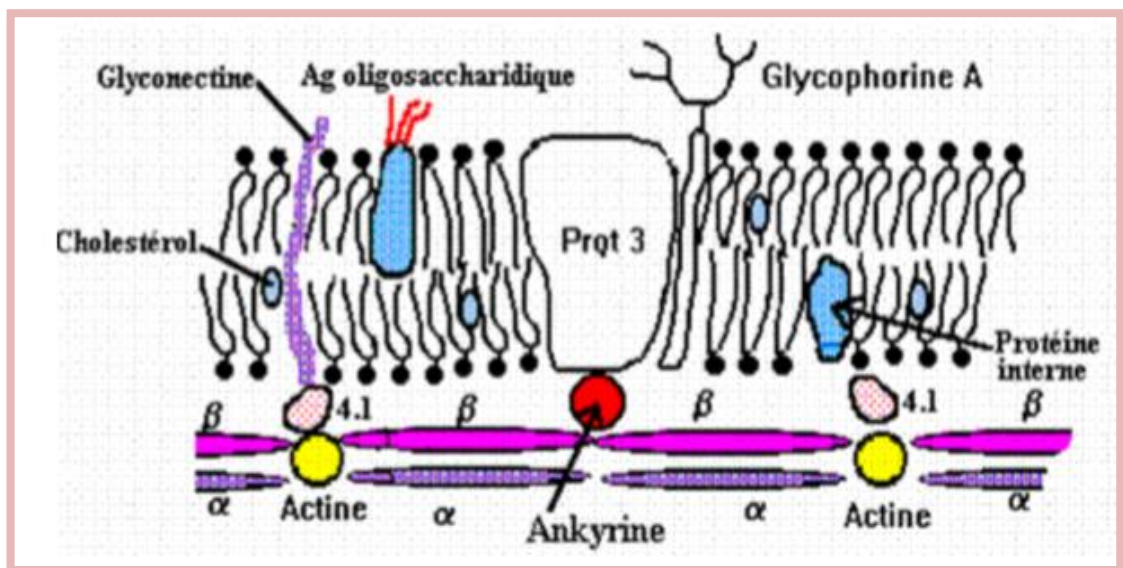


Figure 11 : Structure de la membrane du globule rouge (ZANDECKI, 2006).

3.2. Hémolyse

L'hémolyse est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine. Ce phénomène est le résultat d'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

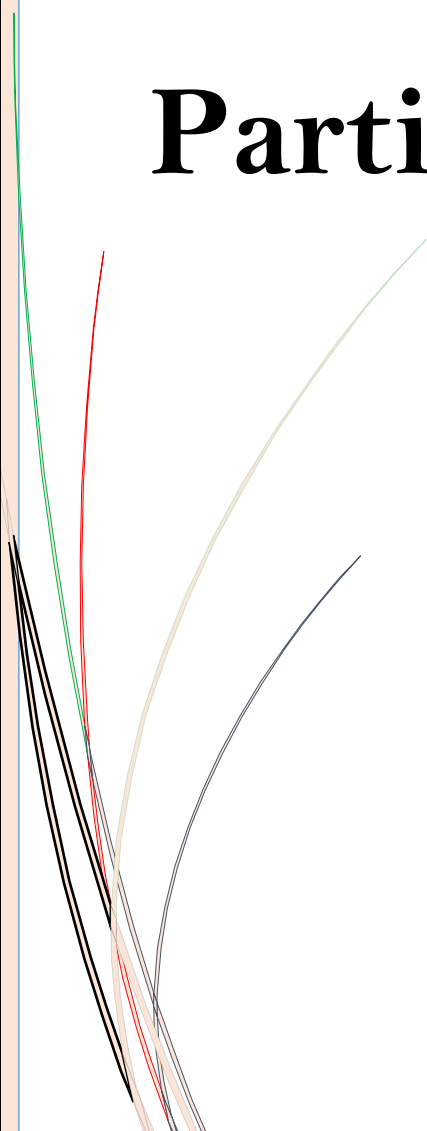
cas l'hémolyse est exagérée, réduisant la durée de vie des hématies on parle alors d'une hyperhémolyse (UCAR, 2002). Ce phénomène peut être liée soit à :

- une anomalie de la membrane érythrocytaire ;
- une anomalie du contenu enzymatique de l'hématie ;
- une anomalie hémoglobinique ;
- une origine extra corpusculaire acquise liée à un agent infectieux, à un facteur toxique ou un facteur mécanique. (AGUILAR-MARTINEZ, 2007).

Les principaux facteurs qui déterminent la flexibilité d'un érythrocyte normal sont : sa forme de disque biconcave ; la flexibilité de sa membrane ; la fluidité de son contenu en hémoglobine. L'intégrité de ces facteurs dépend essentiellement de celle du métabolisme énergétique de la cellule et de son rôle dans diverses fonctions comme la perméabilité membranaire, le pouvoir de réduction et le maintien d'un rapport ATP/Ca^{2+} favorable à la flexibilité du réseau de protéines contractiles, qui constitue le squelette sous-membranaire (LEVY *et al.*, 2008).

Cette hémolyse est la cause de physiopathologies spécifiques telles que les maladies vasculaires aiguës et chroniques, l'inflammation, la thrombose et l'insuffisance rénale.

Partie expérimentale



I. Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie du département de Biochimie et Microbiologie, Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO). Nous nous sommes intéressées à l'évaluation de l'activité antimittotique de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux de feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* et leurs effets sur l'intégrité membranaire érythrocytaire.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

Lors des différents tests réalisés nous avons utilisé le matériel suivant :

➤ **Les feuilles de *Phlomis bovei de Noé***

Après récolte, les feuilles ont été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité puis broyées au moulin électrique. La poudre ainsi obtenue est conservée à 4°C pour des utilisations ultérieures.

➤ **Les racines des bulbes d'oignons**

Des bulbes d'oignons sont mis en contact avec de l'eau pour avoir l'allongement des racines à partir de la zone méristématique caractérisée par une division mitotique importante.

➤ **Le prélèvement sanguin**

Un prélèvement sanguin est réalisé dans un tube hépariné à partir d'un donneur volontaire et sain.

1.1.2. Solvants et réactifs

L'ensemble des solvants et réactifs utilisés, leur concentration et/ ou composition ainsi que leurs rôles sont recensés dans le tableau VII.

Tableau VII : Solvants et réactifs utilisés.

| | Composé | Concentration/ composition | Rôles |
|-----------------|---------------------------------|--|------------------------------------|
| Solvants | Ether de pétrole | Pur | Extraction |
| | Chloroforme | Pur | |
| | Méthanol | 99.7% | Extraction et solubilisation |
| Réactifs | Solution de fixation | V/V : 1/3 (acide acétique (99%) + éthanol (96%)) | Blocage de la division cellulaire. |
| | Solution de coloration | Carmin + eau distillée+ acide acétique | Coloration des chromosomes |
| | Na ₂ CO ₃ | 5% | Basification |
| | HCl | 5% | Acidification et dosage |
| | FeCl ₃ | 5% | Dosage des alcaloïdes |
| | AlCl ₃ | 2% | Dosage des flavonoïdes |
| | Colchicine | 1mg de colchicine + 1ml d'eau distillée | Témoins et standards |
| | Quercétine | 1mg de quercétine + 1ml d'eau distillée | |
| | Eau distillée | Pure | |
| | Saponine | 1mg/ml | |
| | Eau physiologique | Pure | |

V/V : volume/volume.

1.1.3. Matériel du laboratoire

Lors des différentes manipulations nous avons utilisé principalement le matériel suivant :

- Spectrophotomètre de marque SIGMA ;
- Centrifugeuse de marque SIGMA ;
- Lyophilisateur de marque CHRIST ;
- Réfrigérateur de marque DIRECT FREEZ ;
- Plaque chauffante de marque VELP ;
- Bain marie de marque NÜVE ;
- Agitateur de marque STUART ;
- Vortex de marque VF2 ;
- Basculateur de marque APELEX ;
- Balance de précision de marque KERN ;
- Microscope optique de marque OPTICA ;
- Rota-vapeur de marque STUART.

En plus de la verrerie usuelle nous avons particulièrement utilisé des ampoules à décanter pour la séparation des différentes fractions.

1.2. Méthodes

1.2.1. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction de la fraction d'alcaloïdes est obtenue selon la méthode décrite par HARBONE, (1998). Elle est basée sur l'utilisation des solvants à polarité croissante. Les principales étapes d'extraction sont résumées dans la figure 12.

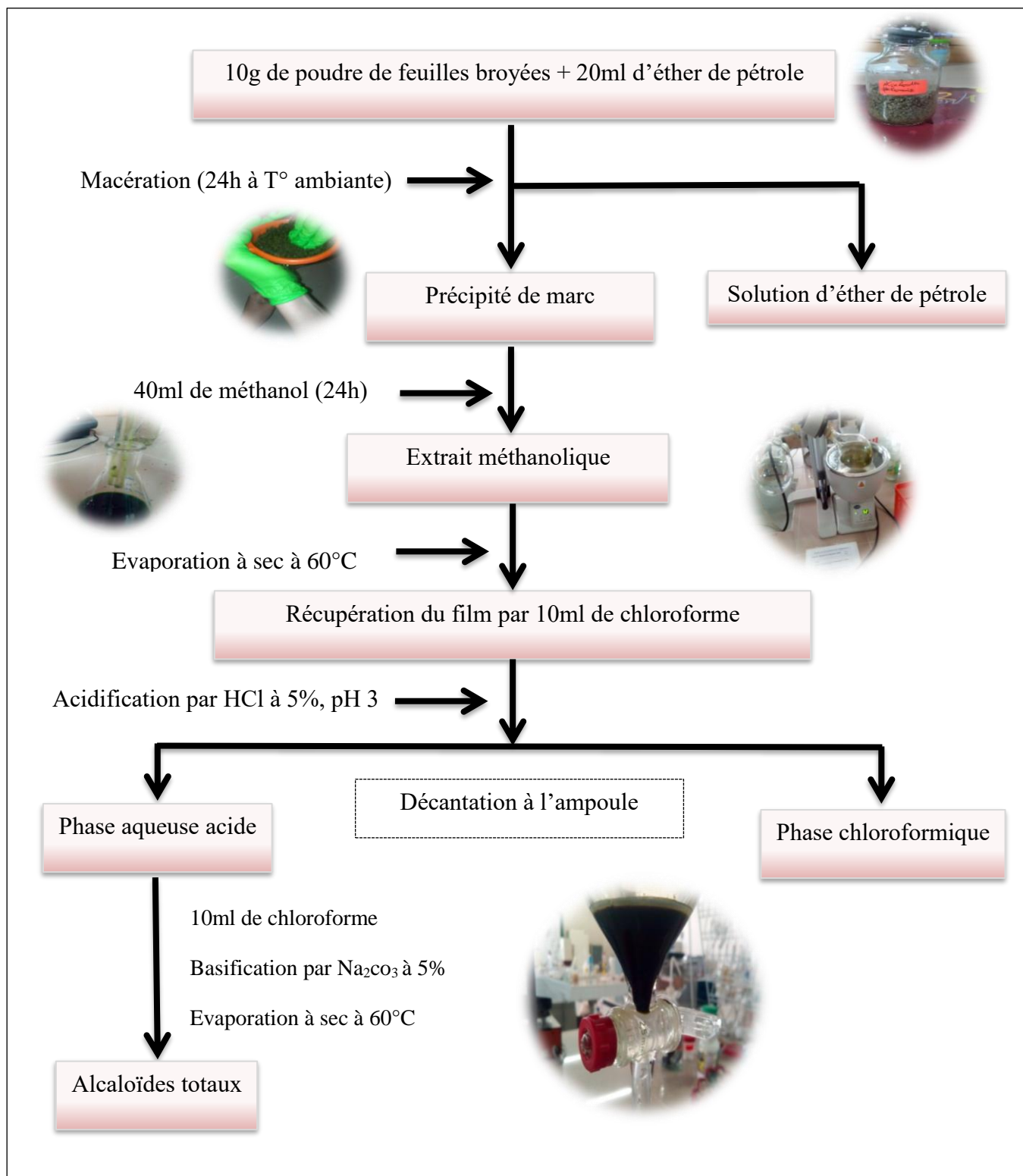


Figure 12 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux (HARBONE,1998).

Après évaporation des solvants, nous avons récupéré nos échantillons selon l'étude à réaliser dans le solvant approprié.

1.2.2. Extraction aqueuse

10 g de poudre de feuilles de *Phlomis bovei* de Noé L. sont mis à macérer dans 100 ml d'eau distillée pendant 24h à température ambiante sous agitation continue. Le macérat aqueux obtenu est filtré successivement à l'aide d'une passoire puis d'un papier Wattman N°1. Le filtrat qui en résulte est réparti dans des cristallisoirs puis congelé pendant 24h à -80°C. Après congélation le filtrat est lyophilisé. Le lyophilisat obtenu est stocké à l'abri de l'humidité et de la lumière pour nos manipulations ultérieures.

1.2.3. Dosages

Afin de déterminer la teneur en alcaloïdes dans la fraction et en alcaloïdes et flavonoïdes dans les extraits aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) des feuilles de *Phlomis bovei* de Noé L. nous avons réalisé les dosages suivants :

1.2.3.1. Dosage des alcaloïdes

Le dosage des alcaloïdes est réalisé suivant la méthode spectrophotométrique de RAGENDRA *et al.*, 2015 ; SHAZIA *et al.*, 2016. Le principe de ce dosage repose sur la réaction des alcaloïdes avec le chlorure ferrique et leur capacité à former des complexes colorés. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 380 nm est proportionnelle à la quantité du complexe formé. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec un standard représenté par la colchicine (1mg/ml) avec des concentrations allant de 20 à 100µg/ml. A partir de la courbe étalon obtenue nous avons déterminé la concentration en alcaloïdes de nos échantillons (extrait aqueux et fraction). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent colchicine par millilitres de la fraction et en milligramme d'équivalent colchicine par gramme d'extrait aqueux.

1.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation quantitative des flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *Phlomis bovei* de Noé L. est réalisée suivant la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (BENDIMERAD et BOUGANDOURA, 2012) avec une optimisation par nos soins. Le principe de cette méthode repose sur les interactions entre certains groupements structuraux des flavonoïdes susceptibles de former par chélation des complexes jaunâtres avec les métaux (Fer

et l'Aluminium). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de ces complexes et atteint son maximum d'absorbance à 430 nm.

Les concentrations en composés flavoniques des extraits aqueux ont été déterminées à l'aide d'une gamme d'étalonnage réalisée avec la quercétine avec des concentrations allant de 10 à 60 µg/ml suivant le protocole de BAHAROU *et al*, 1996. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait aqueux.

1.2.4. Activités biologiques

1.2.4.1. Activité antimittotique

L'évaluation de l'activité antimittotique est réalisée grâce au test *Allium cepa* de SHWETA *et al*, optimisé par OUZID *et al.*, 2019. Les racines des bulbes d'oignons sélectionnées ont été incubées dans la fraction d'alcaloïdes et dans l'extrait aqueux pendant 24h puis fixées et colorées avec du carmin acétique. Après avoir examiné les lames préparées à l'aide du microscope optique au grossissement 400, nous avons opté pour le comptage des cellules normales en division et des cellules aberrantes sur une plage de 350 cellules en prenant en compte toutes les phases de la division cellulaire : prophase (P), métaphase (M), anaphase (A), télophase (T).

Parallèlement, les mêmes étapes ont été réalisées en présence de l'eau distillée et de la colchicine qui représentent respectivement le témoin négatif et le témoin positif.

Les différentes étapes du protocole adopté sont illustrées au niveau de la figure 13 ci-dessous :

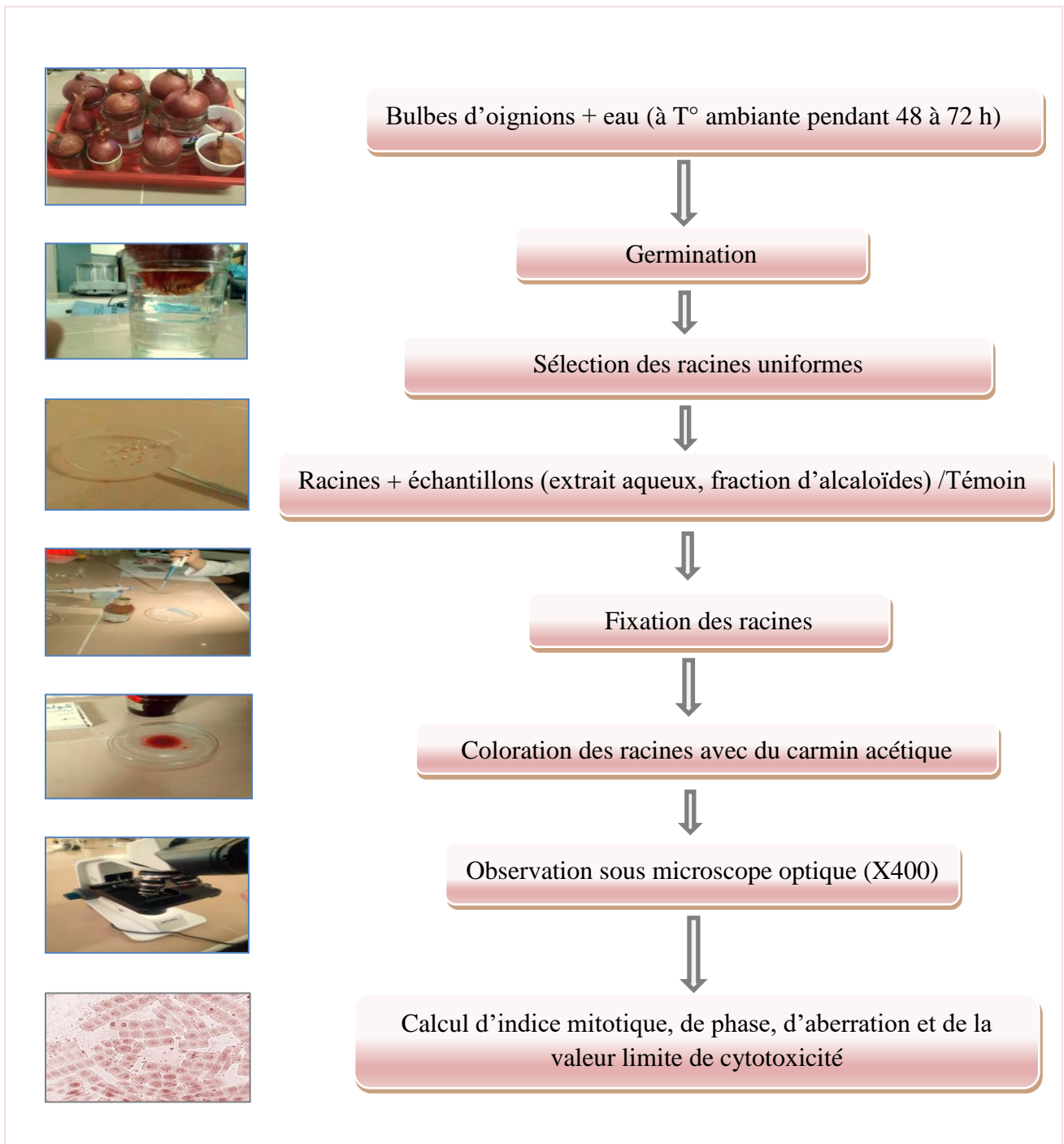


Figure 13 : Etapes de l'évaluation de l'effet antimitotique.

Quatre paramètres biologiques ont été calculé et les résultats sont la moyenne de cinq essais indépendants avec des écarts types ou des erreurs standards pour chaque indice calculé.

1. Indice mitotique (IM) (IKEDA *et al.*, 2000) :

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

2. Indice de phase (GLINSKA *et al.*, 2007) :

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

3. Valeur limite de cytotoxicité (ANTONSIE *et al.*, 1990)

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

4. Indice des aberrations (RACUCUI et CREANGA, 2007)

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

1.2.4.2. Effets de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux sur l'intégrité membranaire érythrocytaire

Le globule rouge est le model biologique le plus utilisé dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité et la facilité de leur suivi au cours de la lyse cellulaire. (SITU et BOBEK, 2000).

1.2.4.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Un prélèvement est effectué sur un tube hépariné. Ce dernier est soumis à une centrifugation à 2500 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant est écarté tandis que le culot est repris, lavé avec de l'eau physiologique. Cette opération est répétée 3 fois de suite. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire des hématies est reconstitué sous forme de suspension globulaire de 2% avec de l'eau physiologique. Le protocole est illustré dans la figure 14.

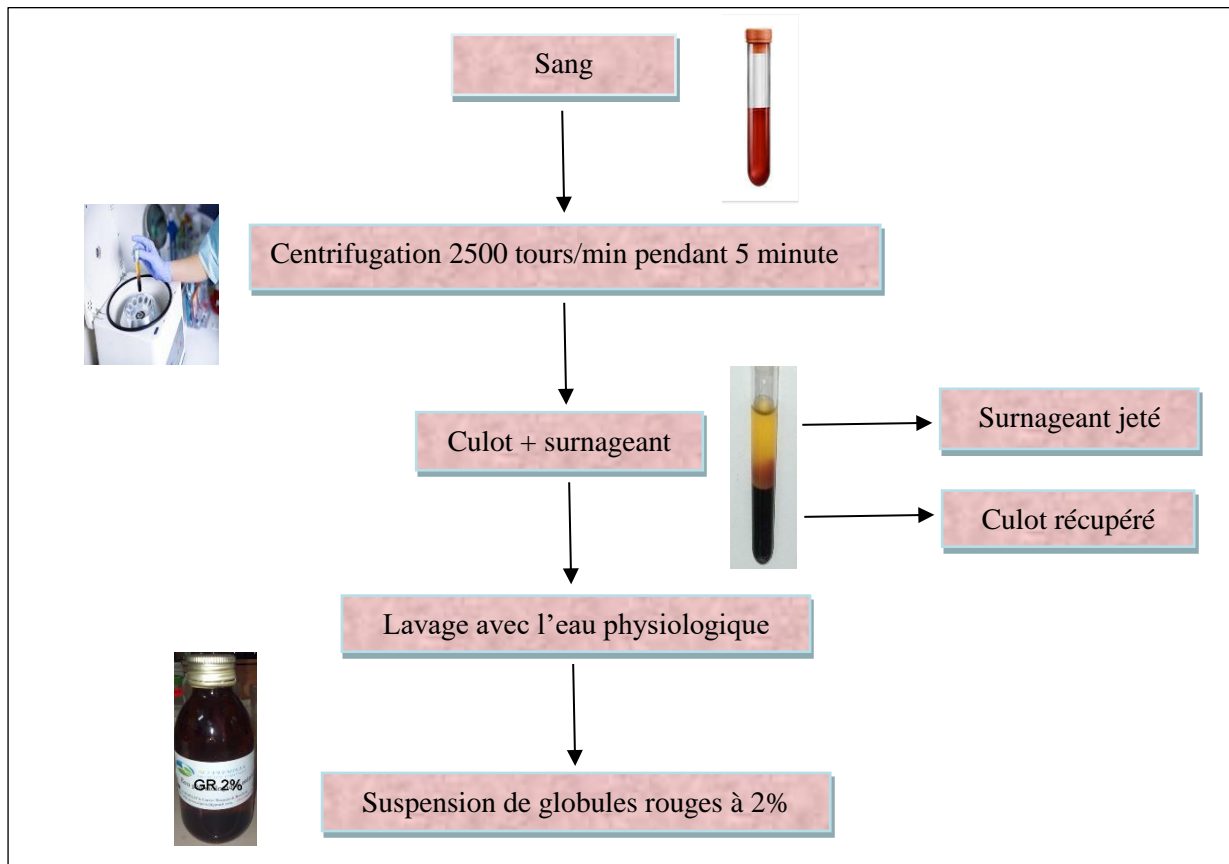


Figure 14 : Etapes de préparation de la suspension de globules rouges.

1.2.4.2.2. Mesure du taux d'hémolyse

L'évaluation *in vitro* de l'effet de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* sur l'intégrité membranaire érythrocytaire est réalisée selon la méthode de DUCHNOWICZ *et al* (2012).

Nous avons mis en contact la suspension globulaire à 2% avec les échantillons préparés. Après une agitation modérée pendant 20 min les tubes sont centrifugés à 2500 tours/minute pendant 5 minutes. Le suivi de l'hémolyse est évalué quantitativement par un dosage spectrophotométrique du taux d'hémoglobine dans le surnageant à 580 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse avec des contrôles représentés par l'eau physiologique et la saponine selon l'équation suivante (LEE, 2002) :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(D.O_{\text{Echantillon}} - D.O_{\text{Contrôle négatif}}) / D.O_{\text{Contrôle positif}}] \times 100$$

Où :

DO _{Echantillon} : Densité optique de la suspension de globules rouges en présence de l'échantillon.

DO _{Contrôle négatif} : Densité optique de la suspension de globules rouges en présence du contrôle négatif (eau physiologique).

DO _{Contrôle positif} : Densité optique de la suspension de globules rouges en présence du contrôle positif (saponine à 1mg/ml).

1.1.5. Analyse statistique

Tous les résultats concernant l'activité antimicrobienne ont fait l'objet d'une analyse statistique par le logiciel STATISTICA version 7.1. La différence entre les échantillons a été déterminée par le test paramétrique ANOVA à un facteur et le niveau de signification a été considéré comme $p < 0.05$. Toutes les valeurs consignées représentent une moyenne de cinq essais indépendants plus au moins une erreur standard.

II. Résultats et discussion

2.1. Activité antimitotique

L'activité antimitotique de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* testée sur les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* est déterminée par le calcul de quatre paramètres biologiques à savoir l'indice mitotique (IM), l'indice de phase (IP), l'indice d'aberration (IA) et la valeur limite de cytotoxicité (VLC).

2.1.1. Indices mitotiques

L'indice mitotique correspond au calcul du nombre des cellules en division sur le total des cellules examinées. Les moyennes des indices mitotiques des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées par la fraction d'alcaloïdes, les extraits aqueux, le témoin positif (colchicine) et le témoin négatif (eau distillée) sont représentés dans la figure 15 ci-dessous :

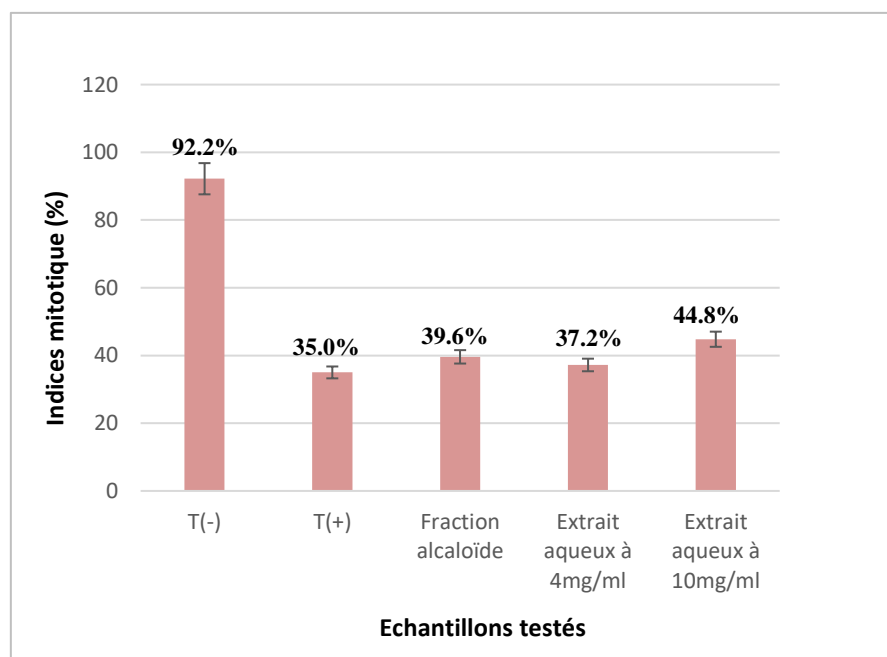


Figure 15 : Moyennes des indices mitotiques de la fraction alcaloïdes et des extraits aqueux testés. *T* (-) : témoin négatif (eau distillée) ; *T* (+) : témoin positif (colchicine).

Les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées avec de l'eau distillée (*T*⁻) présente l'indice mitotique le plus élevé (92,2±1,49%), tandis que leur contact avec la colchicine (*T*⁺) a diminué l'indice mitotique jusqu'à 35,00±1,16%. Par ailleurs, le traitement

des cellules avec la fraction d'alcaloïdes a donné une valeur légèrement supérieure au témoin positif ($39,60 \pm 6,78\%$). D'autre part, leur contact avec l'extrait aqueux (4mg/ml) a donné un indice mitotique de $37,20 \pm 2,22\%$ et qui a augmenté pour atteindre une valeur de $44,80 \pm 6,96\%$ à la concentration de 10mg/ml (Figure 16).

Le modèle expérimental d'*Allium cepa* est l'un des meilleurs tests d'évaluation *in vitro* de l'effet antimitotique à travers une étude microscopique. Cette dernière permet de déterminer l'indice mitotique et de déceler les différentes aberrations et perturbations du cycle cellulaire. Ce test est validé par le Programme de l'Environnement des Nations Unies (UNEP) et le Programme International de la Sécurité Chimique (IPCS). Il est utile pour toute étude préliminaire des substances anticancéreuses (KURAS *et al.*, 2006).

Le traitement des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* avec de l'eau distillée a révélé les phases normales sans perturbation du cycle mitotique, à savoir la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase illustrées au niveau de la figure 16.

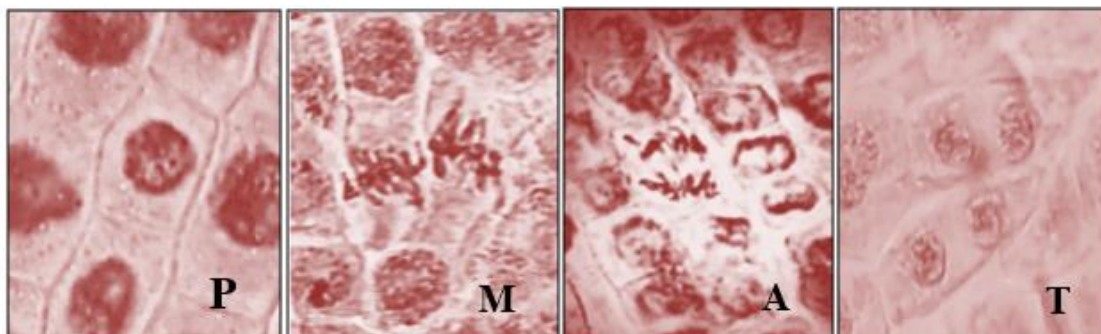


Figure 16 : Différentes phases de la mitose observées au niveau des cellules méristématiques d'*Allium cepa* visualisées sous le microscope optique (X400).

P : Prophase ; *M* : Métaphase ; *A* : Anaphase ; *T* : Télophase.

L'analyse statistique des indices mitotiques des cellules méristématiques traitées par le témoin négatif, témoin positif, fraction d'alcaloïdes et extraits aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) par le test paramétrique ANOVA à un facteur, nous a permis d'effectuer des comparaisons et le niveau de signification a été considéré comme $p < 0,05$. Cette étude a révélé une différence hautement significative avec des P-value $< 0,05$ ($p=0,00$) par rapport au témoin négatif.

La réduction de l'activité mitotique pourrait être due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN ou à un blocage dans la phase G2 du cycle cellulaire, empêchant ainsi la cellule d'entrer

en mitose (SUDHAKAR *et al.*, 2001). Elle pourrait être due aussi soit à des perturbations du cycle cellulaire tel que le blocage de la polymérisation des microtubules par la colchicine, ou bien à un dysfonctionnement de la chromatine induit par un facteur externe, dans ce cas, des interactions *Phlomis bovei de Noé L.* extraits – ADN (BABICH *et al.*, 1997).

La comparaison statistique entre le témoin positif et les différents échantillons, et ces derniers entre eux a révélé des p-value allant de 0,2 jusqu'à 0,7, ce qui indique l'absence d'une différence significative entre eux. Ceci confirme les indices mitotiques rapprochés que nous avons obtenu.

L'indice mitotique du témoin positif constaté dans notre étude ($35,00 \pm 1,16\%$) présente un effet antimitotique proche de celui obtenu dans l'étude faite par docteur OUZID *et al.* (2019) sur *Peganum harmala L.* ($34,00 \pm 1,07\%$), ainsi que celui obtenu par AMANI (2018) sur *Phlomis bovei de Noé L.* qui atteint $38,60 \pm 1,66\%$. Tandis que l'indice mitotique obtenu pour nos extraits aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) représente une baisse par rapport à ceux obtenus par l'étude menée par AMANI ($57,05 \pm 1,31\%$ et $66,70 \pm 2,20\%$).

2.1.2. Indices de phases

L'indice de phase correspond au calcul du nombre des cellules en division (prophase, métaphase, anaphase et télophase) sur le total des cellules examinées.

Les indices de phases des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées par les témoins, la fraction alcaloïdes et les extraits aqueux testés sont reportés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Indices de phase des témoins, de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux testés.

| | P% ± ES | M% ± ES | A% ± ES | T% ± ES |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| T (-) | 82,91±3,08 | 0,62±0,39 | 0,97±0,36 | 8,00±3,54 |
| T (+) | 32,28±1,73 | 0,11±0,05 | 0,28±0,13 | 2,85±0,70 |
| Fraction d'alcaloïdes | 33,20±6,19 | 0,05±0,04 | 0,05±0,04 | 6,62±1,30 |
| Extrait aqueux (4mg/ml) | 32,45±9,94 | 0,00±0,00 | 0,05±0,04 | 5,02±2,31 |
| Extrait aqueux (10mg/ml) | 34,91±6,23 | 0,05±0,04 | 0,00±0,00 | 9,94±2,75 |

ES : erreur standard ; *T (-)* : témoin négatif (eau distillée) ; *T (+)* : témoin positif (colchicine).

L'indice de phases le plus élevé pour la fraction d'alcaloïdes ainsi que pour nos extraits correspond à celui de la prophase, comparativement aux autres stades de la division cellulaire qui sont minoritairement présents. L'indice de prophase atteint 82,91±3,08% pour le T (-) et 32,28±1,73% pour le T (+). Ce dernier se rapproche des indices des prophases de nos échantillons, qui sont compris entre 32,45±9,94% et 34,91±6,23%. Tandis que les autres phases sont moins observées, leurs pourcentages varient entre 0,00±0,00% et 0,97±0,36% pour les métaphases et les anaphases des témoins et des échantillons. En ce qui concerne les télophases, leurs indices atteignent 9,94±2,75% pour l'extrait aqueux (10mg/ml).

Le test statistique ANOVA à un facteur des indices de phases des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées par les témoins et par nos échantillons a donné des p-value allant de 0,1 à 0,9, ce qui montre l'absence d'une différence significative, entre les témoins et les échantillons ainsi qu'entre les échantillons entre eux (voir les annexes).

Le pourcentage élevé des indices de phases au niveau de la prophase chez l'ensemble des échantillons testés indique la présence d'un empêchement de passage aux autres stades de la mitose. Ce blocage est localisé avant la métaphase, ce qui diffère du mécanisme de blocage

de la colchicine (MEDJEBER *et al.*,2018). Selon D'AMATO (1954), le ralentissement de l'engagement des cellules aux autres stades de la division cellulaire peut être également dû, soit à une durée de traitement trop longue soit à l'utilisation de doses trop élevées, ce qui confirme nos résultats obtenus avec la fraction d'alcaloïdes et les extraits aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.*

2.1.3. Indices d'aberrations et anomalies

Différentes anomalies sont rencontrées suite aux traitements des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* avec la colchicine, la fraction d'alcaloïdes et les extraits aqueux à différentes concentrations (4mg/ml et 10mg/ml). Les indices d'aberrations sont recensés dans le tableau IX.

Tableau IX : Indices d'aberrations de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux testés.

| Indice d'aberrations (%) ± ES | T (+) | Fraction d'alcaloïdes | Extrait aqueux (4mg/ml) | Extrait aqueux (10mg/ml) |
|-------------------------------|------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| AG | 5,59±1,42 | 8,85±3,58 | 6,39±1,77 | 11,13±3,94 |
| CB | 0,79±0,65 | 3,08±2,13 | 0,17±0,09 | 0,00±0,00 |
| AL | 0,28±0,19 | 0,62±0,34 | 0,57±0,34 | 0,00±0,00 |
| PC | 0,00±0,00 | 0,05±0,17 | 0,11±0,98 | 0,00±0,00 |
| FR | 1,88±0,55 | 1,25±0,52 | 2,05±0,60 | 0,17±0,15 |
| DP | 0,22±0,14 | 0,74±0,36 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| CG | 0,68±0,40 | 5,19±2,33 | 3,02±1,13 | 1,42±0,78 |
| CS | 0,85±0,37 | 1,20±0,79 | 1,02±0,52 | 0,79±0,59 |
| CA | 0,17±0,15 | 0,51±0,30 | 0,00±0,00 | 3,08±0,67 |
| AC | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| Total | 10,46±3,87 | 21,54±0,55 | 13,33±5,43 | 16,59±6,13 |

ES : erreur standard ; AG : agglutination chromosomique ; CB : cellules binucléées ; AG : allongement des cellules ; PC : ponts chromosomiques ; FR : fragmentation des chromosomes ; DP : désorganisation de la plaque équatoriale ; CG : cellules gigantesques ; CS : cellules sans noyau (cellules fantômes) ; CA : corps apoptotiques ; AC : absence de cytotière.

Les essais antimitotiques ont révélé que la fraction d'alcaloïdes et les extraits aqueux de feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* à différentes concentrations ainsi que la colchicine présentent une inhibition de la division des cellules méristématiques à différents stades de la mitose. Comparativement aux phases mitotiques normales observées en présence d'eau distillée, nous avons constaté diverses aberrations et les plus rencontrées sont les agglutinations avec le plus haut pourcentage. Cette aberration est observée avec un taux de 8,85±3,58% pour la fraction d'alcaloïdes, 6,39±1,77% et de 11,13±3,94% pour les extraits aqueux à 4mg/ml et 10mg/ml respectivement. Des fragmentations avec un taux faible qui varie entre 0,17±0,15%

et $2,05 \pm 0,60$ % pour les différents échantillons testés, de même pour les cellules sans noyaux dont le résultat varie entre $0,79 \pm 0,59\%$ et $1,20 \pm 0,79\%$. Pour ce qui est de la désorganisation de la plaque équatoriale lors de la métaphase, elle a été observée uniquement dans la fraction d'alcaloïdes ainsi que la colchicine. Tandis que les cellules gigantesques sont retrouvées chez les différents échantillons avec des pourcentages rapprochés et d'une valeur maximale $5,19 \pm 2,33\%$. Par ailleurs, les ponts chromosomiques sont moins rencontrés. Des corps apoptotiques ont également été observés en présence uniquement de l'extrait aqueux à 10mg/ml ($3,08 \pm 0,67\%$).

Les pourcentages d'aberration de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* testés ainsi que de la colchicine prise comme standard ont été comparés par une analyse de variances unidirectionnelle (ANOVA à un facteur). Ce test a révélé l'absence d'une différence significative pour toutes les comparaisons, avec des p-value allant de 0,3 à 0,8 (voir annexes).

Le traitement des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* par la colchicine (1mg/ml) qui est connue pour son effet mitodépresseur se résume par un blocage de la formation du fuseau mitotique provoquant ainsi plusieurs anomalies (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001).

Les observations microscopiques ont révélé différents types d'aberrations à savoir : des fragmentations chromosomiques, des agglutinations, des cellules gigantesques et désorganisations chromosomiques de la plaque équatoriale lors de la métaphase. Ces aberrations sont illustrées au niveau de la figure 17.

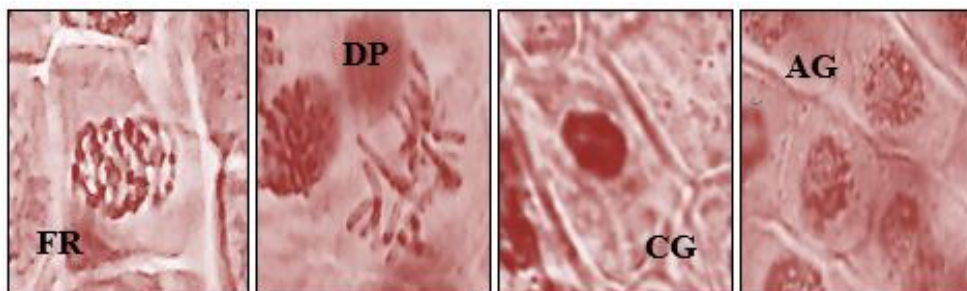


Figure 17 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées par la colchicine (1mg/ml) visualisées sous microscope optique (X400).

FR : fragmentation chromosomique ; *DP* : désorganisation de la plaque équatoriale ; *CG* : cellule gigantesque ; *AG* : agglutination

Par ailleurs, les cellules méristématiques d'*Allium cepa* mis en contact avec la fraction d'alcaloïdes présentent des aberrations importantes et variées : des fragmentations chromosomiques, corps apoptotiques, cellules sans noyaux et désorganisation de la plaque équatoriale lors des métaphases (Figure 18).

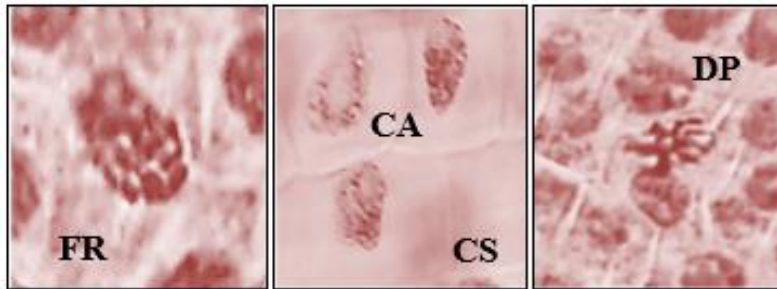


Figure 18 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées avec la fraction alcaloïde visualisées sous microscope optique (X400).

FR : fragmentation chromosomique ; *CA* : corps apoptotique ; *CS* : cellule sans noyau ; *DP* : désorganisation de la plaque équatoriale.

Le traitement des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* par les extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* à différentes concentrations (4mg/ml et 10mg/ml) a généré les mêmes aberrations observées précédemment à savoir des cellules gigantesques, des agglutinations, des allongements de cellules et des cellules binucléées (Figure 19 et 20).

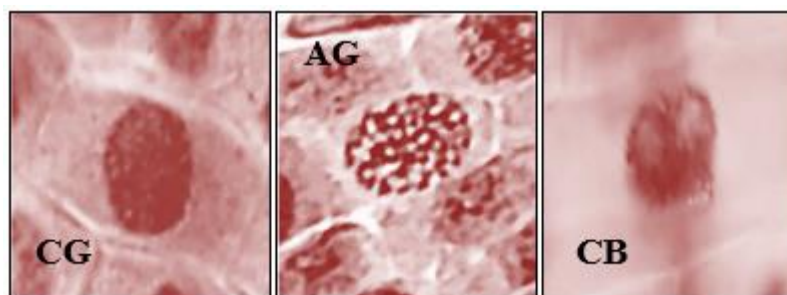


Figure 19 : Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux (4mg/ml) visualisées sous microscope optique (X400).

CG : cellules gigantesques ; *AG* : agglutination ; *CB* : cellule binucléée.

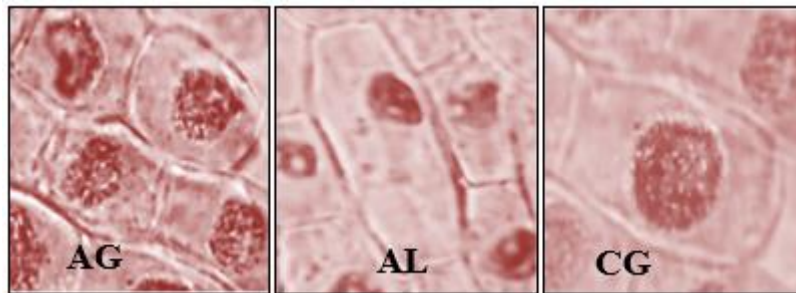


Figure 20 : Anomalies chromosomiques, cellulaires et nucléaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* traitées avec l'extrait aqueux (10mg/ml), visualisées sous microscope optique (X400).

AG : agglutination ; *AL* : allongement de cellule ; *CG* : cellules gigantesques.

Les aberrations chromosomiques sont des changements dans la structure des chromosomes résultant d'une rupture ou d'un échange de matériel chromosomique (TÜLAY et ÖZLEM, 2010).

L'apparition fréquente des agglutinations chromosomiques chez les cellules d'*Allium cepa* est due probablement à une inhibition de l'entrée en prophase et à un blocage de celles qui sont en cours (DEYSSON, 1956). La présence de ponts chromosomiques est un phénomène complexe lié à la fragmentation, à l'aspect collant des chromosomes, aux cassures et réunion des extrémités cassées (KABARITY *et al.*, 1974 ; BADR *et al.*, 1992). Les fragmentations chromosomiques indiquent ainsi le potentiel clastogène de certains composés chimiques issus des plantes (CHUHAN et GUPTA, 2005), elles peuvent être aussi une conséquence des ponts anaphase/télophase (SHARMA et SEN, 2002 ; SINGH, 2003). Leur action sur les chromosomes est généralement localisée au niveau de l'ADN (CHUHAN et SANDARARAMAN, 1990).

Ces anomalies chromosomiques pourraient être provoquées durant la translocation d'échange chromatidique inégal ou dues à la présence de chromosomes dicentriques (KONUK *et al.*, 2007).

L'apparition de cellules binucléées est le résultat de la prévention de la cytokinésie ou de la formation de plaques cellulaires. Des microtubules ont été impliquées dans la formation

de ces plaques et les extraits de feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* peuvent être l'un des facteurs impliqués, entraînant ainsi l'inhibition de la cytokinésie (TÜLAY et ÖZLEM, 2010). En plus des dommages au niveau de l'ADN, les extraits de feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* ont induit également l'apoptose démontrée par l'apparition des corps apoptotiques qui peuvent être engendrés par des concentrations élevées de nos échantillons. Il a été démontré que les composés isolés de *Phlomis* inhibent la prolifération cellulaire et provoquent un arrêt du cycle cellulaire (SARACOGLU *et al.*, 1995 ; KIRMIZIBEKMEZ *et al.*, 2004).

2.1.4. Valeur limite de cytotoxicité

Une diminution de l'indice mitotique en dessous de 22% par rapport au témoin provoque ce qu'on appelle un effet létal sur les cellules en division (ANTONSIEWICZ, 1990). Tandis que sa diminution de 50% est habituellement un effet sublétal (PANDA et SAHU, 1985), elle est nommée « valeur limite de cytotoxicité » (SHARMA, 1983).

Les pourcentages de cytotoxicité de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* testés sont donnés dans le tableau X.

Tableau X : Valeurs limites de cytotoxicité de témoin, de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux testés.

| | IM%±ES | VLC (%) |
|--------------------------|------------|------------|
| T (+) | 35,00±1,16 | 37,96±1,26 |
| Fraction alcaloïde | 39,60±6,78 | 42,95±6,58 |
| Extrait aqueux (4mg/ml) | 37,20±2,22 | 40,34±2,16 |
| Extrait aqueux (10mg/ml) | 44,80±6,96 | 48,59±6,76 |

VLC : valeur limite de cytotoxicité ; *ES* : Erreur standard.

Les valeurs limites de cytotoxicité sont proportionnelles aux valeurs des indices mitotiques. On constate une augmentation de ces valeurs, qui sont de 37,96±1,26% pour la colchicine, 42,95±6,58% pour la fraction d'alcaloïdes, 40,34±2,16% et 48,59±6,76% pour les extraits aqueux à 4mg/ml et 10mg/ml respectivement.

Des ANOVA réalisées entre la colchicine prise comme standard et nos différents échantillons ont montré l'absence d'une différence significative entre ces mesures avec des p-value allant de 0,2 à 0,8. Ce qui confirme les résultats du tableau IX des VLC (voir annexes).

Selon la définition de la valeur limite de cytotoxicité, nous pouvons déduire que la fraction d'alcaloïdes et les extraits aqueux de *Phlomis bovei de Noé L.* sont considérés toxique sur les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa*.

Des études anciennes ont fait le lien entre les espèces du genre *Phlomis* et les divisions cellulaires qui ont démontré l'effet anti-tumorale de deux espèces : *P. tuberosa* et *P. umbrosa turez* (CHUNG *et al.*, 1981).

Récemment, de nombreuses études portant sur l'activité antimitotique effectuées sur des cellules méristématiques des racines d'*Allium cepa* ont conclu que plusieurs espèces de la même famille que le genre *Phlomis* présentent des effets sur la division cellulaire (SHIKH, 2012). A titre d'exemple *Scutellaria barbata* qui est largement utilisée pour ses effets anti tumoraux (LEE *et al.*, 2004 ; TAN *et al.*, 2004). Une étude sur les extraits foliaires de cette plante a montré l'arrêt du développement des cellules cancéreuses en phase G1, et a diminué la taille des tumeurs solides (YIN *et al.*, 2004). La perturbation de la division cellulaire observée par tous ces travaux concorde avec nos observations.

2.2. Dosages

2.2.1. Dosage des alcaloïdes

La détermination de la teneur en alcaloïdes de la fraction et des extraits aqueux est basée sur l'équation de la courbe étalon de la colchicine $Y = 0.0072 X$ (Figure 21), cette dernière nous a révélé 136 µg EC/ml pour la fraction et 130,44µg EC/g d'extrait aqueux.

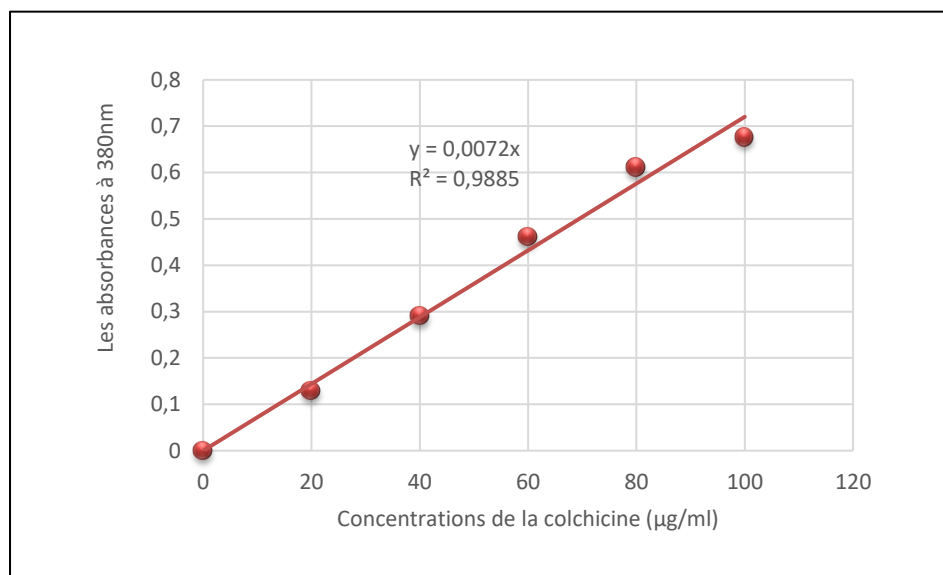


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la colchicine.

La recherche des alcaloïdes a toujours été un centre d'intérêt pour de nombreuses études notamment celles menées par JOHN *et al.*, (2014) et TABASUM *et al.*, (2016) qui ont trouvé ces métabolites secondaires dans les extraits foliaires de *Justicia beddomi* et *Abrus precatorius* respectivement, à des concentrations importantes. Contrairement à la faible teneur obtenue dans notre étude. Ces différences de concentrations qui varient d'une plante à une autre sont fortement liées aux types d'extractions ainsi qu'à l'environnement de ces plantes.

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes dans l'extraits aqueux est basée sur l'équation de la courbe étalon de la quercétine $Y=0,0175X$ (Figure 22), cette dernière nous a révélé une concentration de 33,94 µg EQ/g d'extrait aqueux.

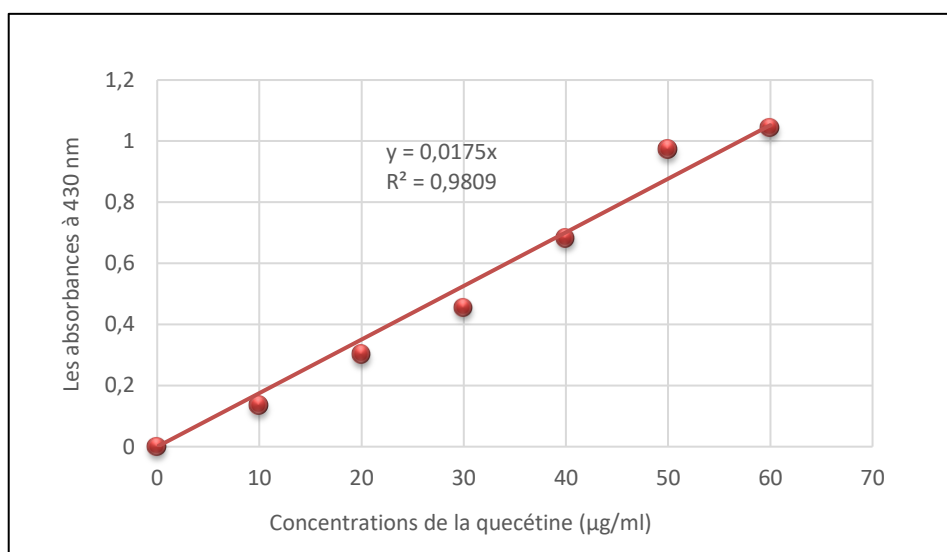


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Cette concentration reste importante par rapport à l'étude qui a été menée par SAFFIDINE *et al.*, (2015) sur l'activité antioxydante et antibactérienne de *Plantago major*. L'analyse réalisée par TABASUM *et al.*, (2016) a révélé également une quantité importante en flavonoïdes dans l'extrait brute hydrométhanolique d'*Abrus precatorius L.*

Des études ont montré que plusieurs facteurs peuvent avoir une forte influence sur le contenu en polyphénols tels que les facteurs géographiques, climatiques et les facteurs génétiques, mais aussi le degré de maturation de la plante et la durée de stockage (AGANGA, 2001 ; PEDNEAULT *et al.*, 2001).

2.3. Effets de la fraction d'alcaloïde et de l'extrait aqueux sur l'intégrité de la membrane érythrocytaire

L'évaluation de l'effet de nos échantillons sur l'intégrité membranaire érythrocytaire nous a permis de calculer le pourcentage d'hémolyse, provoqué par la fraction d'alcaloïdes et les extraits aqueux testés des feuilles de *Phlomis bovei de Noé*. Ce taux est proportionnel à la quantité d'hémoglobine libérée. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux XI.

Tableau XI : Taux d'hémolyse provoqué par la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux testés.

| Echantillons | Concentration | DO à 530 nm | Taux d'hémolyse%±S |
|-----------------------|---------------|-------------|--------------------|
| Extrait aqueux | 4 mg/ml | 0,015 | 0,86±0,15 |
| | 10 mg/ml | 0,114 | 6,30±4,54 |
| Fraction d'alcaloïdes | - | 0,879 | 48,16±14,94 |

DO : densité optique.

Le test d'hémolyse a montré que les extraits aqueux à 4mg/ml et 10mg/ml ont donné un taux respectif de 0,86±0,15% et de 6,30±4,54%. Par ailleurs, la fraction d'alcaloïdes a provoqué un effet hémolytique élevé de l'ordre de 48,16±14,94%.

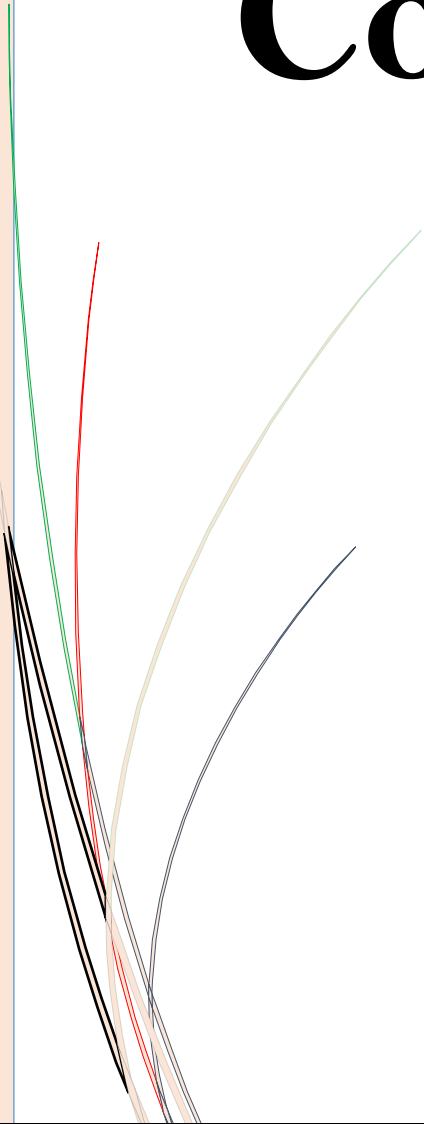
L'hémolyse totale obtenue par la saponine est due à sa capacité d'induire la formation des pores dans les membranes cellulaires et ainsi entrainer l'hémolyse des globules rouges. Cette activité est généralement expliquée par l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane cellulaire des érythrocytes en particulier le cholestérol, avec lesquelles elles forment des complexes insolubles (DAS *et al.*, 2012).

Nous avons observé un effet hémolytique faible de l'extrait aqueux à différentes concentrations. Cet effet est dû à la présence des composés phénoliques qui permettent la prévention de la formation de la méthémoglobine suite au piégeage du peroxyde d'hydrogène et la diminution de la formation du radical hydroxyle, ce qui permet la prévention des dommages oxydatifs et empêchant ainsi la production d'hémolyse (NADOUR, 2015). Sachant que notre extrait contient des flavonoïdes, donc nos résultats peuvent être expliqués par l'interaction des flavanols et les procyanidines (classes des flavonoïdes) avec les groupements polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes. Ainsi que leur accumulation à la surface membranaire réduit l'accès des molécules radicalaires à la bicouche lipidique. C'est par ce mécanisme que les flavonoïdes pourraient maintenir l'intégrité membranaire (VERSTRAETEN *et al.*, 2003 ; RAMCHOUN *et al.*, 2015).

L'interaction d'un composé cytotoxique avec la membrane des globules rouges provoque la perte de leur intégrité ce qui conduit à leur lyse ceci peut expliquer l'effet

hémolytique provoqué par la fraction d'alcaloïdes notamment les alcaloïdes de classe stéroïdes (TIWARI *et al.*, 2011).

Conclusion



Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales locales, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antimitotique et cytotoxique des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* Nous avons évalué l'effet antimitotique de la fraction d'alcaloïdes et des extraits aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* sur les cellules racinaires d'*Allium cepa*. Les résultats obtenus montrent que la fraction d'alcaloïdes et les extraits aqueux (4mg/ml et 10mg/ml) exercent une inhibition de la mitose par la perturbation du fuseau mitotique, ce qui est marqué par le déclin de l'indice mitotique jusqu'à $39,60 \pm 6,78\%$ pour la fraction d'alcaloïdes, $37,20 \pm 2,22\%$ pour l'extrait aqueux à 4mg/ml et $44,80 \pm 6,96\%$ pour l'extrait aqueux à 10mg/ml qui est accompagné d'anomalies nucléaires, chromosomiques et cellulaires à savoir : les agglutinations, les fragmentations chromosomiques, les corps apoptotiques... Par ailleurs l'estimation de la teneur en alcaloïdes et en flavonoïdes dans nos échantillons était l'objet d'un dosage colorimétrique. Cette analyse quantitative a révélé $136 \mu\text{g EC/ml}$ pour la fraction et $130,44 \mu\text{g EC/mg}$ pour l'extrait aqueux. Tandis que la teneur en flavonoïdes est estimée à $33,94 \mu\text{g EQ/mg}$ dans l'extrait aqueux.

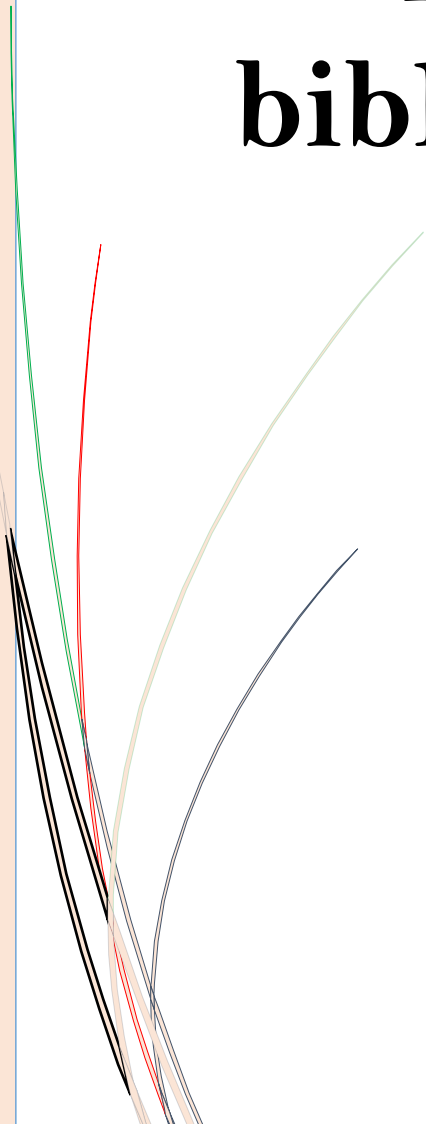
Les pourcentages de cytotoxicité évalué par le calcul de la VLC ont révélé que la fraction d'alcaloïdes ($48,59 \pm 6,76\%$) et les extraits aqueux ($40,34 \pm 2,16\%$ et $42,95 \pm 6,58\%$) des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* testés ont un effet toxique sur les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* ($48,59 \pm 6,76\%$).

Nous avons également testé l'effet de nos échantillons sur l'intégrité membranaire érythrocytaire où nous avons souligné un taux d'hémolyse faible de l'ordre de $0,86 \pm 0,15\%$ pour l'extrait aqueux à 4mg/ml et de $6,30 \pm 4,54\%$ pour l'extrait aqueux à 10mg/ml. La fraction d'alcaloïdes a révélé à son tour un taux d'hémolyse élevé de l'ordre de $48,16 \pm 14,94\%$.

Pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles de nombreuses perspectives peuvent être envisagées à savoir :

- réaliser des extractions avec d'autres solvants ;
- identifier les différentes classes d'alcaloïdes responsables de nombreuses activités biologiques par des techniques analytiques de hautes performances (HPLC, RMN...)
- évaluer l'activité anti mitotique sur d'autre systèmes biologiques (culture cellulaire) ;
- évaluer d'autres activités biologiques éventuelles.

Références bibliographiques



ABEDENI A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat en science du médicament. Université Lille 2, France.

AGUILAR-MARTINEZ P. (2007). H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine. Montpellier- Nimes, France.

AKROUM S. (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat en sciences. Université de Constantine, Algérie.

ALBALADEJO R.G., AGUILAR J.F., APARICIO A. and GONZALO N. (2005). Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (Lamiaceae). *Taxon*, 54(4) : 987-998.

ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., et ROBERTS K. WALTER P. (1997). L'essentiel de la biologie cellulaire. Médecine-Science, 3ème Ed., Lavoisier, Paris.

ALLAIN P. (2002). Les médicaments – Pharmacologie. Cdm Editions, 3^{ème} Ed. Bouchemaine.

ANTOINE G. (2009). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours, Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1-L2 UE PHR, France.

BABA AISSA F. (1999). Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Encyclopédie Des Plantes Utiles.

BABICH H., SEGALL M.A. and FOX K.D. (1997). The Allium test- a simple, eukaryote genotoxicity assay. *American Biology Teacher*, 59(9) : 580–583.

BADIAGA M. (2012). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat en chimie organique. Université de Bamako, Mali.

BAI R.L., PETIT G.R. and HAMEL E. (1990). Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimetabolic agents near the exchangeable

nucleotide and vinca alkaloid sites. *The Journal Biological Chemistry*, 265 (28) :141–149.

BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D. and IDAOMAR M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 446-475.

BELCHER., GREGORY M. et VERCELLOTTI. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood Journal*, 8 : 121.

BELOUED A. (1935). Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées et utilisées dans le nord de l’Afrique. Imprimeries la Typo-Litho et Jules Carbonel réunies, Alger.

BENHAMMOU N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l’Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en biologie. Université de Tlemcen, Algérie.

BETINA-BENCHARIF S. (2014). Isolement et caractérisation de saponosides extraits de deux plantes médicinales *cyclamen africanum*, *zygophyllum cornutum* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire. Thèse de doctorat en biotechnologie végétale, université de Constantine 1, Algérie et en pharmacognosie, université de Bourgogne, France.

BOLLAG D M., MC QUENEY PA., ZHU J., HENSEN O., KOUPAL L., LIESCH J., MICHEL G., LAZARIDES E. and WOODS C.M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Research*, 55 (11) : 2325–2333.

BOUDJOUREF M. (2011). Etude de l’activité antioxydante et antimicrobienne d’extraits d’*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie. Université de Sétif, Algérie.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales, 3^{ème} Ed, Technique et Documentation, Paris.

CHEESEMAN I.M. and DESAI A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biological*, 9(1) : 33-46.

CHEVREMONT M. (1980). Cytologie et Histologie. Maloine, 2^{ème} Ed., Paris.

CHUHAN L.K.S. and GUPTA S.K. (2005). Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Pesticide Biochemistry And Physiology Journal*, 82(1) : 27-35.

CHUHAN L.K.S. and SUNDARARAMAN V. (1990). Effects of substituted ureas on plant cells : Cytological effects of isopruturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Cytologie*, 55 (11) : 91-98.

CHUNG B.S., KIM J.W. et LEE H.K. (1981). Saengyak Hackeoechi, *In* Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de doctorat. Université de Constantine, Algérie.

COLOMBEL V. (2009). Synthèse et étude de l'activité biologique de nouveaux analogues du N-acétylcolchinol. Thèse de doctorat en chimie organique. Université Claude Bernard - Lyon I, France.

COULERIE P. (2012). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Thèse de doctorat en chimie des substances naturelles. Université de la Nouvelle-Calédonie, France.

COULERIE P. (2012). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Thèse de doctorat en chimie des substances naturelles. Université de la Nouvelle-Calédonie, France.

DAS T.K., BANERJEE D., CHAKRABORTY D., PAKHIRA M.C., SHRIVASTAVA B. and KUHAD R.C. (2012). Saponin : Role in Animal system. *Veterinary World's Journal*, 5(4) : 248-254.

DEYSSON G. (1956). Les facteurs de la mito-inhibition végétale. *In* André THOMAS J., 1956.

DOMINIK J., SCHAER., PAUL W., BUEHLER., ABDU I., ALAYASH., JOHN D., BELCHER., GREGORY M. and VERCELLOTTI. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood Journal*, (8) : 121.

ELALAOUI M.D. (2014). Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique des grains de *Nigella sativa L.* Mémoire Master, Biochimie Appliquée. Université Tlemcen, Algérie.

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

EPSIE M., EXTRA JM., COTTU PH., CUVIER C. et MARTY M. (1998). Médicaments anticancéreux. *In* Schorderet M., 1998.

GORHAM J. (1977). Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry*, 16 : 249-253.

GORIN N.C., PHILIP T. et SYMANN M. (1996). Manuel pratique d'hématocancérologie et de chimiothérapie. Frison-Roche, Paris.

GRAVOT A. (2009). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Université de Rennes, France.

GUERITTE F. and FAHY J. (2005). The vinca alkaloids. *In* Cragg G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., 2005.

GUIGHARD J.L. (1998). Botanique. Masson, 11^{ème} Ed., Paris.

GUIGNARD J.L., (1996). Biochimie Végétale. Masson, Paris.

GUIGNARD JL., COSSON L. et HENRY M. (1985). Abrégé de Phytochimie. Masson, Paris.

GUILLAUME L. (2007). Elasticité de squelette de globules rouge humain : Une étude en pince optique. Thèse de doctorat en Biochimie Et Biologie Moléculaire. Université de Paris, France.

HAIT W.N., RUBIN E., ALLI E. and GOODINA S. (2006). Tubulin Targeting Agents. *Cancer Therapeutics Uct.*, 37 : 18.

HARBORNE J.B. (1980). Plant Phenolics : Encyclopedia of Plant Physiology. New series.

HARBORNE J.B. et **WILLIAMS C A.** (2000). Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6) : 481-504.

HARTWELL J.L. (1982). Plants Used Against Cancer. *In Cragg et al.*, 2005.

HASLAM E. (1994). Natural polyphenols (vegetable tannins) : Gallic Acid Metabolism. *Natural Products*, 11 : 41-66.

HELLAL Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister en biologie. Université de Tizi-Ouzou, Algérie.

HELLER W. and **FORKMANN G.** (1993). The flavonoids : Advances in research since 1986. *In Harborne J.B. Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology.* Chapman et Hall, London.

HERNANDEZ-OCHOA L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat en sciences d'agressources. Institut National Polytechniques de Toulouse, France.

ISERIN P., MASSON M., RESTELLINI JP., YBERT E., DE LAAGE DE MEUX A., MOULARD F., ZHA E., DE LA ROQUE R., DE LA ROQUE O., VICAN P., DEELESALLE -FEAT T., BIAUJEAUD M., RINGUET J., BLOTH J. et BOTREL A. (2001). Larousse des Plantes Médicinales : Identification, Préparation et Soins. VUEF, 2^{ème} Ed., Hong Kong.

JOHN B., SULAIMAN C.T., GEORGE S. and REDDY V.R.K. (2014). Spectrophotometric estimation of total alkaloids in selected *Justicia species*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5) : 647-648.

KABARATY A., EL-BAYOUMI A.S. et HABIB A.A. (1974). Effects of morphine sulphate on mitosis of *Allium cepa* root tips. *Biologia Plantarum*, 16 : 275-282.

KARP G. (1998). Biologie Cellulaire et Moléculaire : Concepts et expériences. De Boeck, Bruxelles.

KATAYOUN MS., MOHAMMED A. and AFSANEH G. (2004). The essential oils composition of *Phlomis herba-venti L* : Leaves and flowers of Iranian origin. *Flavour and Fragrance Journal*, 19 : 29–31.

KIRMIZIBEKMEZ H., CALIS I., PEROZZO R., BRUN R., DONMEZ A.A. and LINDEN A. (2004). Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmoidal enoyl-ACP reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Medica*, 70 : 711-7.

KONE D. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales Maliennes : extraction, identification d'alcaloïdes, caractérisation et quantification des polyphénols : étude de l'activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali.

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

KOUDALY S., BENEMASAOUD., LEFT D., ESSAQUI A., ZERBOUTI M., AZZI M. et BENAÏSSA M. (2014). Study of antioxidant activity and anticorrosion of the methanol extracts of drawf palm leaves (*Chamaerops humilis L.*) from Morocco. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3) : 887-898.

KOWALSKI RJ., GIANNAKAKOU P. et HAMEL E. (1997). Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol(R)). *Biology Chemistry Journal*, 272 (4) : 2534–41.

KURAS M., NOWAKAWSKA J., SLIWINSKA E., PILARSKI R., ILASZ., TYKARSKAT., ZOBEL A. and GULEWICZ K. (2006). Changes in chromosome structure, Mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Ucareia tomentosa* (Willd) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 107 (2) : 212-221.

LAMY E., RAWEL H., SCHWEIGERT FJ., SILVA FC., FERREIRA A., COSTA AR., ANTUNES C., ALMEIDA AM., COELHO AV. and SALES-BAPTISTA E. (2014). The effect of tannins on mediterranean ruminant ingestive behavior : The role of the oral cavity. *Molecules*, 16 : 2766-2784.

LEE T. K., LEE D.K., KIM D. I. LEE Y. C., CHANG Y. C. and KIM C. H. (2004). Inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don on human uterine leiomyoma smooth muscle cell proliferation through cell cycle analysis. *International Immunopharmacology*, 4 : 447-454.

LEE Z. and XIAO K.H. (2005). Podophyllotoxins and Analogs. In Cragg G.M., Kingston D.G.I., Newman D.J., 2005.

LEVY V. (2008). Hématologie et Transfusion. Masson, 2^{ème} Ed., Paris.

LIOLIOS C., LAOUER H., BOULAACHEB N., GORTZI O. and CHINOUI I. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei de Noe subsp. Bovei*. *Molecules*, 12 : 772–781.

MABUCHI I. (1986). Biochemical Aspects of Cytokinesis. *International Reviews Cytology*, 101 : 175-213.

MACHEIX J.J., FLEURIET A. et SARNI-MANCHADO P. (2006). Les Polyphénols en Agroalimentaire. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

MAILLET M. (2002). Biologie cellulaire. Masson, Paris.

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

MAYER A.M. (2004). Resistance to herbivores and fungal pathogens : Variations on a common theme, a review comparing the effect of secondary metabolites, induced and constitutive, on herbivores and fungal pathogens. *Journal of Plant Sciences*, (52) : 279-292.

MEDJEBER M., SMAIL-SAADOUN N. et SAIDI F. (2018). Activité antimitotique de deux espèces d'aspergillus : mycoendophytes foliaires de *Limoniastrum feei* (girard) batt. D'Oued Aghlal (Bechar, Algérie). *Agrobiologia*, 8(1) : 871-878.

NACOUлма A.P. (2012). Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians* : Aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles Europe, Belgique.

NADOUR M. (2015). Extraction, caractérisation des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire. Thèse de doctorat, université de mouloud Mammeri de TiziOuzou.

OUZID Y., SMAIL-SAADOUN N. and HOUALI K. (2019). Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal Extracts of endophytic foliar fungi of peganum harmala L. from Dayate Aiat (Laghouat, Algeria). *Journal of Fundamental Applied Science*, 11(2) : 587-604.

PARIS M. et HURABIELLE M. (1981). Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie). Tome 1. Masson, Paris,

PARIS M. et HURABIELLE M. (1981). Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie). Masson Tome2, Paris.

PAWLOWSKA A.M., DE LEO M. and BRACA A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits : Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54 (26) : 10234-10238.

PEEKING A., PICAND B., HACENE K., LOKIEC F. et GUERIN P. (1987). Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique : Artères et Veines. Publications médicales. *AGCF*, 6 : 512-513.

PELLETIER S.W. (1983). Chemotaxonomic investigation of the plant a des families of Apocynacea, Logoniacea and Rubiaceae by their indole alkaloid content *In* : Alkaloids chemical and biological perspectives, 1983.

RIBEREAU-GAYON P. (1968). Les Tannins, les Composés Phénoliques des Végétaux. Dunod, Paris.

ROUX D. et CATIER O. (2007). Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie. 3^{ème} Ed. Wolters Kluwer, Dalian.

SARACOGLU I., INOUE M., CALIS I. and OGIHARA Y. (1995). Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 18 : 1396-400.

SHARKEY T.D.H.E. (1991). Stomatal Control of Trace Gas Emissions. Trace Gas Emission by Plants. Physiological Ecology, Academic Press, San Diego.

SHIKH S., NAZAM N., LONE. M.I. and AHMAD W. (2012). Dichlorophene and dichlorvos mediated genotoxic and cytotoxic assessment on root meristem cells of *Allium cepa*. *Science Diliman*, 1 : 13-22.

SITU H. and BOBEK L. A. (2000). In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 44(6) :1485-1493.

SUDHAKAR K.N., NINGE GOWDA K.N. and VENU K.N. (2001). Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*, *Cytologia*, 66(3) : 235–239.

TAN B. K. H. and VANTITA J. (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effect of some traditional Chinese medicinal herbs. *Current Medicinal Chemistry*, 11 : 1423-1430.

THOMAS L. (2013). Haemolysis as influence and interference factor. *JIFCC*, 13 (4).

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

UCAR K. (2002). Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncology*, 16 (9) :163-70.

VERPOORTE R. and ALFERMANN AW. (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic, Dordrecht.

VERSTRAETEN S.V., KEEM C.L., SCHMITZ H.H., FRAGA CG. and OTEIZA PI. (2003). Flavan-3ol and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure : Free radical. *Journal of Biomedical*, 34 (37) :84-92.

VINDIER-PINARD P., LANSIAUX A. et BALILLY C. (2001). Cambretastatin A4 phosphat. *Bulletin du Cancer*, 88 (3) : 235-239.

WICHTL M. et **ANTON R. (2009).** Plantes Thérapeutiques Traditionnelles, Pratique Officinale, Science et Thérapeutique. Lavoisier, Paris.

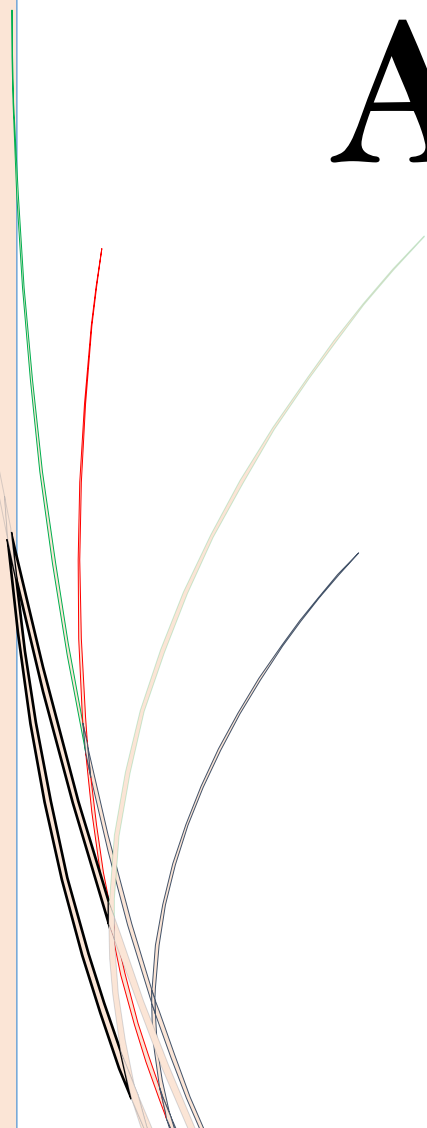
YESILADA E. and **GÛRBÛZ I. (2002).** A compilation of the studies on antiulcerogenic effects of medicinal plants. *Recent progress in medicinal Plants*, (2). In : S. Singh, V.K. Singh, J.N. Govil. Phytochemistry and Pharmacology, SCITech Publishing LLC. Houston.

YIN X., ZHOU J., JIE C., XING D. and **ZHONG Y. (2004).** Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Science*, 75 : 2233-2244.

ZENK H. and **JUENGER M. (2007).** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68 : 2757-2772.

ZIEGLER J. and **FACCHINI P.J. (2008).** Alkaloid Biosynthesis : Metabolism and Trafficking. Annual Reviews, *Plant Biology*, 59 : 735 – 769.

Annexes



Résultats des tests statistiques

Annexe 1 : Comparaison des indices mitotiques des témoins et des échantillons par le test paramétrique ANOVA à un facteur.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 40449,60 | 1 | 40449,60 | 4106,558 | 0,000000 |
| T- et T+ | 8179,60 | 1 | 8179,60 | 830,416 | 0,000000 |
| Erreur | 78,80 | 8 | 9,85 | | |

Figure 1 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin négatif et le témoin positif.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|----------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 43428,10 | 1 | 43428,10 | 361,1484 | 0,000000 |
| Fraction et T- | 6916,90 | 1 | 6916,90 | 57,5210 | 0,000064 |
| Erreur | 962,00 | 8 | 120,25 | | |

Figure 2 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin négatif et la fraction d'alcaloïdes.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 41860,90 | 1 | 41860,90 | 2332,084 | 0,000000 |
| T- et EX-AQ 4mg/ml | 7562,50 | 1 | 7562,50 | 421,309 | 0,000000 |
| Erreur | 143,60 | 8 | 17,95 | | |

Figure 3 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin négatif et l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 46922,50 | 1 | 46922,50 | 371,0755 | 0,000000 |
| T- et EX-AQ 10mg/ml | 5616,90 | 1 | 5616,90 | 44,4199 | 0,000158 |
| Erreur | 1011,60 | 8 | 126,45 | | |

Figure 4 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin négatif et l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|-----------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 13912,90 | 1 | 13912,90 | 117,0135 | 0,000005 |
| T+ et Fraction | 52,90 | 1 | 52,90 | 0,4449 | 0,523530 |
| Erreur | 951,20 | 8 | 118,90 | | |

Figure 5 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin positif et la fraction d'alcaloïdes.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 13032,10 | 1 | 13032,10 | 785,0663 | 0,000000 |
| T+ et EX-AQ 4mg/ml | 12,10 | 1 | 12,10 | 0,7289 | 0,418064 |
| Erreur | 132,80 | 8 | 16,60 | | |

Figure 6 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin positif et extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 15920,10 | 1 | 15920,10 | 127,2590 | 0,000003 |
| T+ et EX-AQ 10mg/ml | 240,10 | 1 | 240,10 | 1,9193 | 0,203338 |
| Erreur | 1000,80 | 8 | 125,10 | | |

Figure 7 : Comparaison de l'indice mitotique entre le témoin positif et extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 14745,60 | 1 | 14745,60 | 116,1071 | 0,000005 |
| Fraction et EX-AQ 4mg/ml | 14,40 | 1 | 14,40 | 0,1134 | 0,744985 |
| Erreur | 1016,00 | 8 | 127,00 | | |

Figure 8 : Comparaison de l'indice mitotique entre la fraction et extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 17808,40 | 1 | 17808,40 | 75,61953 | 0,000024 |
| Fraction et EX-AQ 10mg/ml | 67,60 | 1 | 67,60 | 0,28705 | 0,606688 |
| Erreur | 1884,00 | 8 | 235,50 | | |

Figure 9 : Comparaison de l'indice mitotique entre la fraction et extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IM (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|-------------------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 16810,00 | 1 | 16810,00 | 126,2012 | 0,000004 |
| EX-AQ 4mg/ml et EX-AQ 10mg/ml | 144,40 | 1 | 144,40 | 1,0841 | 0,328227 |
| Erreur | 1065,60 | 8 | 133,20 | | |

Figure 10 : Comparaison de l'indice mitotique entre l'extrait aqueux à 4mg/ml et extrait aqueux à 10mg/ml.

Annexe 2 : Comparaison des indices de phases des témoins et des échantillons par le test paramétrique ANOVA à un facteur.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 10245,76 | 1 | 10245,76 | 13,74905 | 0,000665 |
| T- et T+ | 2028,92 | 1 | 2028,92 | 2,72265 | 0,107176 |
| Erreur | 28317,50 | 38 | 745,20 | | |

Figure 11 : Comparaison de l'indice de phase entre le témoin négatif et le témoin positif.

| Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | | |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 10962,39 | 1 | 10962,39 | 14,22166 | 0,000553 |
| T- et fraction | 1727,52 | 1 | 1727,52 | 2,24113 | 0,142643 |
| Erreur | 29291,29 | 38 | 770,82 | | |

Figure 12 : Comparaison de l'indice de phase entre le témoin négatif et la fraction.

| Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | | |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 10569,00 | 1 | 10569,00 | 14,07329 | 0,000586 |
| T- et EX-AQ 4mg/ml | 1888,70 | 1 | 1888,70 | 2,51492 | 0,121061 |
| Erreur | 28537,88 | 38 | 751,00 | | |

Figure 13 : Comparaison de l'indice de phase entre le témoin négatif et l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | | |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 11801,29 | 1 | 11801,29 | 15,05814 | 0,000402 |
| T- et EX-AQ 10mg/ml | 1416,10 | 1 | 1416,10 | 1,80691 | 0,186850 |
| Erreur | 29781,15 | 38 | 783,71 | | |

Figure 14 : Comparaison de l'indice de phase entre le témoin négatif et entre l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | | |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 3559,071 | 1 | 3559,071 | 15,91741 | 0,000291 |
| T+ et fraction | 12,111 | 1 | 12,111 | 0,05416 | 0,817218 |
| Erreur | 8496,650 | 38 | 223,596 | | |

Figure 15 : Comparaison de l'indice de phase entre le témoin positif et la fraction.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 3336,468 | 1 | 3336,468 | 16,37373 | 0,000246 |
| T+ et EX-AQ 4mg/ml | 2,510 | 1 | 2,510 | 0,01232 | 0,912212 |
| Erreur | 7743,243 | 38 | 203,770 | | |

Figure 16 : Comparaison de l'indice de phase entre le témoin positif et l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 3750,613 | 1 | 3750,613 | 16,34999 | 0,000248 |
| Fraction et EX-AQ 4mg/ml | 3,594 | 1 | 3,594 | 0,01567 | 0,901050 |
| Erreur | 8717,028 | 38 | 229,395 | | |

Figure 17 : Comparaison de l'indice de phase entre la fraction et l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 4498,429 | 1 | 4498,429 | 17,16217 | 0,000184 |
| Fraction et EX-AQ 10mg/ml | 15,463 | 1 | 15,463 | 0,05899 | 0,809400 |
| Erreur | 9960,296 | 38 | 262,113 | | |

Figure 18 : Comparaison de l'indice de phase entre la fraction et l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IP (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|-------------------------------|---|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 4247,721 | 1 | 4247,721 | 17,53181 | 0,000161 |
| EX-AQ 4mg/ml et EX-AQ 10mg/ml | 33,966 | 1 | 33,966 | 0,14019 | 0,710172 |
| Erreur | 9206,889 | 38 | 242,287 | | |

Figure 19 : Comparaison de l'indice de phase entre l'extrait aqueux à 10mg/ml et l'extrait aqueux à 4mg/ml.

Annexe 3 : Comparaison des indices d'aberrations du témoin positif et des différents échantillons par le test paramétrique ANOVA à un facteur.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données9) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 51,04012 | 1 | 51,04012 | 9,320872 | 0,006847 |
| T+ et Fraction | 6,08304 | 1 | 6,08304 | 1,110877 | 0,305835 |
| Erreur | 98,56613 | 18 | 5,47590 | | |

Figure 20 : Comparaison de l'indice d'aberration du témoin positif et de la fraction d'alcaloïdes.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données9) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 28,29820 | 1 | 28,29820 | 8,009121 | 0,011098 |
| T+ et EX-AQ 4mg/ml | 0,41184 | 1 | 0,41184 | 0,116563 | 0,736746 |
| Erreur | 63,59845 | 18 | 3,53325 | | |

Figure 21 : Comparaison de l'indice d'aberration du témoin positif et de l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données9) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 36,5851 | 1 | 36,58512 | 4,902860 | 0,039957 |
| T+ et EX-AQ 10mg/ml | 1,8788 | 1 | 1,87884 | 0,251789 | 0,621901 |
| Erreur | 134,3159 | 18 | 7,46200 | | |

Figure 22 : Comparaison de l'indice d'aberration du témoin positif et de l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données9) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 60,6216 | 1 | 60,62162 | 9,870326 | 0,005640 |
| Fraction et EX-AQ 4mg/ml | 3,3293 | 1 | 3,32928 | 0,542069 | 0,471064 |
| Erreur | 110,5525 | 18 | 6,14181 | | |

Figure 23 : Comparaison de l'indice d'aberration de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données9) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|----------------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 72,5043 | 1 | 72,50432 | 7,199635 | 0,015183 |
| Fraction et EX-AQ 10 mg/ml | 1,2005 | 1 | 1,20050 | 0,119209 | 0,733896 |
| Erreur | 181,2700 | 18 | 10,07055 | | |

Figure 24 : Comparaison de l'indice d'aberration de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour IA (Feuille de données9) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 44,7603 | 1 | 44,76032 | 5,506993 | 0,030586 |
| EX-AQ 4mg/ml | 0,5314 | 1 | 0,53138 | 0,065377 | 0,801089 |
| Erreur | 146,3023 | 18 | 8,12791 | | |

Figure 25 : Comparaison de l'indice d'aberration de l'extrait aqueux à 4mg/ml et de l'extrait aqueux à 10mg/ml.

Annexe 4 : Comparaison des valeurs limites de cytotoxicité (VLC) du témoin positif et des différents échantillons par le test paramétrique ANOVA à un facteur.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|--|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 15543,70 | 1 | 15543,70 | 112,5120 | 0,000005 |
| T+ et Fraction | 21,30 | 1 | 21,30 | 0,1542 | 0,704819 |
| Erreur | 1105,21 | 8 | 138,15 | | |

Figure 26 : Comparaison de la VLC du témoin positif et de la fraction d'alcaloïdes.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|--|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 15330,36 | 1 | 15330,36 | 786,8804 | 0,000000 |
| T+ et EX-AQ 4mg/ml | 14,11 | 1 | 14,11 | 0,7244 | 0,419444 |
| Erreur | 155,86 | 8 | 19,48 | | |

Figure 27 : Comparaison de la VLC du témoin positif et de l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------|--|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 18727,26 | 1 | 18727,26 | 127,3081 | 0,000003 |
| T+ et EX-AQ 10mg/ml | 281,85 | 1 | 281,85 | 1,9161 | 0,203679 |
| Erreur | 1176,81 | 8 | 147,10 | | |

Figure 28 : Comparaison de la VLC du témoin positif et de l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|--------------------------|--|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 17568,25 | 1 | 17568,25 | 111,9686 | 0,000006 |
| Fraction et EX-AQ 4mg/ml | 10,60 | 1 | 10,60 | 0,0675 | 0,801503 |
| Erreur | 1255,23 | 8 | 156,90 | | |

Figure 29 : Comparaison de la VLC de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux à 4mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|---------------------------|--|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 20011,75 | 1 | 20011,75 | 72,67906 | 0,000028 |
| Fraction et EX-AQ 10mg/ml | 148,19 | 1 | 148,19 | 0,53819 | 0,484127 |
| Erreur | 2202,75 | 8 | 275,34 | | |

Figure 30 : Comparaison de la VLC de la fraction d'alcaloïdes et de l'extrait aqueux à 10mg/ml.

| Effet | Tests Univariés de Significativité pour VLC (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse | | | | |
|-------------------------------|--|------------------|----------|----------|----------|
| | SC | Degr. de Liberté | MC | F | p |
| ord. origine | 20943,44 | 1 | 20943,44 | 126,2766 | 0,000004 |
| EX-AQ 4mg/ml et EX-AQ 10mg/ml | 79,52 | 1 | 79,52 | 0,4795 | 0,508254 |
| Erreur | 1326,83 | 8 | 165,85 | | |

Figure 31 : Comparaison de la VLC de l'extrait aqueux à 4mg/ml et de l'extrait aqueux à 10mg/ml.

ملخص

في إطار تثمين ورفع شأن الطب التقليدي، هناك اهتمام متزايد في العقود الأخيرة بدراسة النباتات الطبية واستخداماتها العلاجية. تعتبر خياطات الجراح " *Phlomis bovei de Noé L.* " إحدى النباتات المستوطنة المدرجة في التقرير الوطني للتنوع البيولوجي. وهي معروفة بمجموعتها الواسعة من التطبيقات المختلفة نظرا لتنوع المركبات النشطة بيولوجيا التي تحويها. وفي هذا السياق أجرينا دراسة تتضمن تقييم القدرة المضادة لجزء قلوي ومستخلص مائي لأوراق نبتة خياطات الجراح بواسطة اختبار *AlliumCepa*. فلو حظ وجود تأثير على الانقسام الخلوي بمقدار $39,60 \pm 6,78$ % بالنسبة للجزء القلوي و $37,20 \pm 2,22$ % بالنسبة للمستخلص المائي ذات التركيز 4mg/ml وما يعادل $44,80 \pm 6,96$ % للمستخلص المائي ذات التركيز 10mg/ml , مما أدى إلى ظهور تشوهات نووية، صبغية وخلوية كتراص وتجزئة الصبغيات وغيرها. أما قياس قيمة حد المفعول السام على الخلايا كشف أن مختلف العينات لها تأثير على الانقسام الخلوي. من جهة أخرى أعطى التحليل الكمي للقلويات والفلافونويد اعتمادا على اختبار الطيف اللوني قيمة تقدر ب $136\mu\text{gEC/g}$ بالنسبة للجزء القلوي و $130,44 \mu\text{gEC/g}$ بالنسبة للمستخلص المائي. فيما يخص كمية الفلافونويد في هذا الأخير قدرت ب $33,94 \mu\text{gEC/g}$. بينما اختبار انحلال الدم الذي اجري باستخدام طريقة الطيف الضوئي اظهر معدل انحلال يوافق $\pm 0,880.5$ % و $6,30 \pm 4,54$ % للمستخلصات المائية ذو التراكيز 4mg/ml و 10mg/ml على التوالي. كشف الجزء القلوي بدوره مستوى انحلال مرتفع قدر بحوالي $48,16 \pm 14,94$ %.

الكلمات المفتاحية : *Phlomis bovei de Noé L.*, الجزء القلوي, المستخلص المائي, المفعول المضاد للانقسام الخلوي, المفعول السام على الخلايا.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations en thérapeutiques. *Phlomis bovei de Noé L.* est l'une des plantes endémiques répertoriées dans le Rapport National sur la Diversité Biologique. Elle est connue pour son large éventail d'applications qui sont liées à la diversité des composés bioactifs qu'elle renferme. C'est dans cet axe que notre étude a été menée et porte sur l'évaluation du potentiel antimittotique d'une fraction d'alcaloïdes et d'un extrait aqueux des feuilles de *Phlomis bovei de Noé L.* par le test *Allium cepa*. Un effet mitodépressif a été constaté sur la division cellulaire avec un taux de $39,60\pm 6,78\%$ pour la fraction d'alcaloïdes, $37,20\pm 2,22\%$ pour l'extrait aqueux à 4mg/ml et $44,80\pm 6,96\%$ pour l'extrait aqueux à 10mg/ml, générant ainsi des anomalies nucléaires, chromosomiques et cellulaires à savoir les agglutinations, les fragmentations chromosomiques, les corps apoptotiques...etc. La valeur limite de cytotoxicité a révélé que les différents échantillons testés ont un effet toxique sur la division cellulaire. Par ailleurs l'analyse quantitative des alcaloïdes et des flavonoïdes par un dosage colorimétrique a donné une teneur de 136 µg EC/ml pour la fraction et 130,44µg EC/g pour l'extrait aqueux. Tandis que la teneur en flavonoïdes a été estimée à 33,94 µg EQ/g dans ce dernier. Le test d'hémolyse réalisé par une méthode spectrophotométrique a montré que les extraits aqueux à 4mg/ml et 10mg/ml ont donné un taux d'hémolyse respectif de $0,86\pm 0,15\%$ et de $6,30\pm 4,54\%$. La fraction d'alcaloïdes a révélé à son tour un taux élevé de l'ordre de $48,16\pm 14,94\%$.

Mots clés : *Phlomis bovei de Noé L.*, fraction d'alcaloïdes, extraits aqueux, effet antimittotique, effet cytotoxique, *Allium cepa*.

Abstract

In the context of the valorisation of traditional medicine, there has been a growing interest in recent decades in the study of medicinal plants and therapeutic uses. *Phlomis bovei de Noé L.* is one of the endemic plants listed in the National Report on Biological Diversity. It is known for its wide range applications that are related to the diversity of the bioactive compounds it closes. It is in this area that our study was conducted. It focuses on evaluating the antimittotic potential of the alkaloid fraction and aqueous extract of *Phlomis bovei de Noé* leaves by *Allium cepa* test. A mitodepressive effect was observed on cell division, with a rate of $39.60\pm 6.78\%$ for the alkaloid fraction, $37.20\pm 2.22\%$ for the aqueous extract at 4mg/ml and $44.80\pm 6.96\%$ for the aqueous extract at 10mg/ml, thus generating nuclear, chromosomal and cellular anomalies namely agglutinations, chromosomal fragmentations, apoptotic bodies... The limit value for cytotoxicity revealed that the different samples tested had a cytotoxic effect on cell division. Moreover, the quantitative analysis of alkaloids and flavonoids by colorimetric assay gave a yield of 136 µg EC/ml for the fraction and 130.44µg EC/g for the aqueous extract. While the flavonoid content was assessed at 33.94 µg EQ/g in the latter. The hemolysis test carried out by a spectrophotometric method showed that the aqueous extracts at 4mg/ml and 10mg/ml gave a respective rate of $0.86\pm 0.15\%$ and $6.30\pm 4.54\%$. The alkaloid fraction in turn revealed a high rate of about $48.16\pm 14.94\%$.

Keywords : *Phlomis bovei de Noé L.*, alkaloids fraction, aqueous extracts, antimittotic effect, cytotoxic effect, *Allium cepa*.