

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA – Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Génétique Appliquée

Thème

Activités antiproliférative, génotoxique et antigénotoxiques des extraits de deux plantes médicinales sur le cycle cellulaire de *Allium cepa*

Présenté par :

M^{elle} BAAZIZ Fatma

M^{elle} BOUHSSANE Selma

Membre de jury : Grade et lieu :

Président : M^{me} ATMANI D. M.C.B.(U.A.M.B.)

Promotrice : M^{me} BENAIDA-DEBBACHE N. M.A.A. (U.A.M.B.)

Examinatrice : M^{me} BOUDAOU-OUAHMED H. M.A.A. (U.A.M.B.)

Examinatrice : M^{elle} TAHIRI W. M.A.A. (U.A.M.B.)

2012/2013

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le bon dieu "Allah", le tout Puissant, et le Miséricordieux, qui nous a inspiré de bien fait, le courage à achever ce travail. Et pour tout on lui rend grâce.

*Nous remercions chaleureusement notre promotrice **Mme DEBBACHE .N.** qui nous a accordé l'honneur de diriger ce modeste travail, sa disponibilité, son aide précieuse, sa patience, sa confiance placée en nous et surtout sa gentillesse. Aujourd'hui nous vous exprimons Madame toute notre reconnaissance.*

*Les travaux pour la réalisation de ce mémoire on été faite au laboratoire génétique et immunologie, nous remercions **Mr ATMANI** et **Mme ATMANI** de nous avoir ouvert les portes de laboratoire pour tout type de recherches et questions.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury, d'avoir accepté de juger notre travail : **Mme ATMANI.D** pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir accepté de présider le jury.*

***Mme OUAHMED.H,** **Melle TAHIRI.W.** Pour l'honneur qu'elles nous on fait d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

*Sans oublier les membres du laboratoire: **Melle AYOUNI,** **Melle CHIRAFI,** **Mme BERBOUCHA,** et tous les enseignants qui ont contribué à notre formation qu'ils retrouvent à travers ce mémoire le fruit de leurs longues années de travail.*

*Nous remercions très spécialement **NAIMA,** l'ingénieure de laboratoire, pour son grand aide durant toute la période de ce travail, sons oublier **WAHIBA,** **KENZA** et **LILA.***

Le mérite en revient largement à ceux qui ont encouragé et suivi la réalisation de ce travail

Et que ces lignes soient le témoignage de nos sincères reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire

Fatima et selma

Dédicaces

*A la mémoire de mon grand père
Celui qui ma toujours encourager
Celui qui a planté le vouloir de réussite en moi
Mon grand exemple dans la vie, que son âme repose en paix*

*A mes parents, mon père qui ma soutenue, ma mère, qui ma supportée et m'a aidée
dans les pires moments tout au long de ma carrière d'étude, car tu as toujours cru en
moi, aujourd'hui je suis ce que je suis.*

*A mon adorable sœur nawel, et mon adorable frère yacine, qui mon toujours
partager mes soucis*

*A ma grande famille, a ma grand mère qui a toujours prié pour moi
A mon chère oncle Med cherif qui est plus qu'un oncle pour moi, qu'il n'a jamais me
manquer de rien, mon exemple de succès et réussite, a tata hayet, a mes adorables
cousins hocine et ryad*

*A ma chère tante hadjila, pour son grand cœur et libéralité, mon exemple de
modestie et générosité, a oncle Med, a mes adorables cousins mehdi et lamine
A ma chère tante assia, qui m'a toujours écouté et conseillé, mon exemple de
patience et sensibilité, a tonton youcef.*

*A ma chère tante amel, pour son accompagne et disponibilité a toute manière, mon
exemple de gentillesse, tendresse et douceur.*

A son fiancé abd elkrim

A ma chère tante fatiha qui a tend prié pour moi.

Merci à tous Je ne peux témoigner ma reconnaissance.

*Au docteur M. OUGUERGOUZ, a R. OUGUERGOUZ, K. HERMOUCH et à tout le
personnel de la pharmacie OUGUERGOUZ*

*A mes camarades de labo, sidali, ghania, kahina, hemza, et leila, son oublier massi et
Atmane, massina et tout le reste de groupe de biochimie pour leur ambiance au
laboratoire.*

A tout mes amis (e) chaqu'un a son nom, pour leur soutient et aide.

*A ma camarade de ce mémoire, ma condisciple fatima, qui ma accompagner durant
ce travail, aujourd'hui on est arrivé la car nous étions ensemble compatible.*

selma

Dédicaces

Mes dédicaces vont à ma très chère mère qui a toujours veillé et insisté sur ma réussite dans mes études et à mon père pour son affection et apport financier et moral ;

À La mémoire de mes grands-mères Aïcha et Dahbia

À ma très chère et unique sœur Amina et son fiancée Sofiane

À mes frères Akli et Chérif ;

À mes oncles et mes tantes ;

À tous mes cousins et cousines ;

À ma chère voisine Katia et son mari Kamel ;

À tous mes amis (Chafia, Djazia, Kahina, Keltoum, Nadjet,

Malika, Meriem, Sara, Salima, Souhila, Soussou, Souad,

Warda, Yasmine (ma chère youyou), Yasmîna, Houâda, Zara,

Billal, Tarik, Lyess, Sid ali et pour le petit Amine).

À mes voisins de paillasse (ghania, Liela, , Hamza, Athman,

massina et spécialement Massinissa, Assia et Nabila)

À ma binôme Selma et l'ensemble de sa famille. Je n'oublierai

jamais tous les moments mémorables qu'on a passé ensemble

durant l'élaboration de ce mémoire ;

À toute la promotion de génétique 2012-2013

fatima

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
CaSo4	Sulfate de calcium
C2H4O2	Acide acétique
DMSO	Diméthyle Sulfate Oxyde
ERO	Espèce réactif de l'oxygène
HCL	Chlorure d'hydrogène
IM	Indice mitotique
G1	Gap 1
G2	Gap 2
KCL	Chlorure de sodium
MgSo4	Sulfate de magnésium
NaHCo3	Bicarbonate de sodium
P/V	Poid/volume
S	Synthèse
Smart	Somatic mutation and recombination test
UV	Ultra violet

Liste des figures

Numéro du figure	Titre de la figure	Numéro de la page
Figure 1	principe de test de Ames	9
Figure 2	Cellules présentant différents niveaux de dommages mis en évidence par le test des comètes.	10
Figure 3	les activités biologiques des composés naturels	12
Figure 4	présentation schématique des cascades de transduction du signal modifié par les antioxydants	16
Figure 5	bulbes d'ognon (les premières étapes de l'expérience)	21
Figure 6	l'effet de l'Azide de sodium sur le taux de croissance des racines d' <i>Allium cepa</i>	24
Figure 7	l'effet de l'azide de sodium et de l'extrait de <i>P.nigra</i> sur le taux de croissance des racines	25
Figure 8	l'effet l'azide de sodium et de l'extrait d' <i>U.campstris</i> sur le taux de croissance des racines.	25
Figure 9	l'effet de l'extrait de <i>P .nigra</i> sur le taux de croissance des racines prétraitées avec l'azide de S	27
Figure 10	effet de l'extrait de <i>U.campstris</i> sur le taux de croissance des racines prétraitées	27
Figure 11	l'effet de l'azide de sodium sur l'indice mitotique de <i>Allium cepa</i>	30
Figure 12	l'effet de l'extrait de <i>P.nigra</i> sur l'indice mitotique.	30
Figure 13	l'effet de l'extrait de <i>U.campstris</i> sur l'indice mitotique	31
Figure 14	l'effet antimutagénique de l'extrait de <i>P.nigra</i> sur l'indice mitotique	31
Figure 15	l'effet antimutagénique de l'extrait de <i>U.campstris</i> sur l'indice mitotique	32
Figure 16	Les différentes cellules de <i>Allium cepa</i> observées en présence de différents traitements	34

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de la page
Tableau I	les différents types d'agents mutagènes	3
Tableau II	Réactivité avec l'ADN des espèces impliquées dans le stress oxydatif	4
Tableau III	l'évaluation de l'activité mutagénique et antimutagénique de différentes plantes.	14
Tableau IV	le nombre de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire de racine d' <i>Allium cepa</i> observées chez les différents groupes expérimentaux	29
Tableau V	Le pourcentage d'aberrations chromosomiques observées dans le cycle cellulaire d' <i>Allium cepa</i> chez les groupes expérimentaux	36

Sommaire

Titre	Numéro de la page
Introduction	1
Partie théorique	
I- synthèse bibliographique	2
I.1 Activité mutagénique et anti-mutagénique :	2
I.1.1 Les mutagènes	2
I.2 Les composés actifs d'origine végétale	5
I.2.1 Classification	5
a. les composés phénoliques ou polyphénols	5
b. Les flavonoïdes	5
c. Les tanins	6
d. Les alcaloïdes	6
e. Autres composés	6
I.3 Activité mutagénique et antimutagénique	7
I.3.1 Méthodes d'étude de l'activité mutagénique et antimutagénique	7

I.3.2 Activité mutagenique et antimutagenique des composés actifs végétales	12
Partie pratique	
II. Matériels et méthodes	
II.1 Matériels	17
II.1.1 Produits chimiques	17
II.1.2 Autres matériels	17
II.1.3 Matériels végétales	17
II.2 méthodes	20
II.2.1 préparation des extraits	20
II.2.2 Evaluation de l'activité génotoxique et anti-génotoxique	21
II.3 Analyse statistique	23
III. Résultats et discussion	
III.1 Résultats	24
III.1.1 Résultats macroscopiques	24
III.1.2 effet des extraits et du mutagène sur le cycle de <i>A. cepa</i>	28
III.2 Discussion	38
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Les organismes vivants sont fréquemment exposés aux agents environnementaux possédant la capacité à induire des altérations chromosomiques, un phénomène qui conduit au développement des cancers et à la mort cellulaire.

L'utilisation des plantes en médecine empirique a été à l'origine de plusieurs recherches scientifiques, qui peuvent aboutir à la découverte de substances originales présentant un intérêt thérapeutique considérable. Dans le domaine d'étude de molécules à activité anti-génotoxique, un programme de recherche de nouveaux produits antiproléfiratifs, antimutagéniques et antitumoraux est entrepris (Wiart, 2000). Cependant, plusieurs études ont rapporté que de nombreux composés extraits de plantes peuvent avoir des effets toxiques, génotoxiques et cancérigènes (Ernst, 2004; Rietjens et al., 2005).

Les études de génotoxicité et antigénotoxicité des ressources naturelles extraits de plantes permettent d'évaluer l'innocuité et l'efficacité d'un produit (Romero et al., 2005), qui peuvent conduire à l'élaboration de stratégies visant à réduire le risque de développer un cancer chez l'Homme (Amorim et al., 2007; Lanini et al., 2009).

Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des plantes médicinales a réduit considérablement le taux d'aberrations chromosomiques en utilisant plusieurs modèles expérimentaux (Sánchez et al., 2008; Akinboro et al., 2007).

Dans cette étude le test *Allium cepa* a été utilisé pour déterminer le pouvoir cytotoxique, génotoxique et antimutagénique des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et d'écorce de *Ulmus campestris*.

I.1 Activité mutagénique et anti-mutagénique

Le terme mutation se réfère à toute modification du matériel génétique, qui aboutit à une modification des caractéristiques phénotypiques de ce dernier (albinisme, tumeurs...). Les altérations peuvent impliquer un gène unique, un ensemble de gènes ou un chromosome entier (Knezevic *et al.*, 2005).

Les effets concernant les gènes uniques peuvent résulter des effets d'une mutation ponctuelle ou de profondes modifications y compris des délétions (Horn *et al.*, 2008).

Les effets sur des chromosomes peuvent entraîner des modifications structurelles ou numériques.

Une mutation des cellules germinales dans les organismes à reproduction sexuée peut être transmise à la descendance (Ennis, 2001).

I.1.1 Les mutagènes

Les mutations spontanées lors de la réplication sont très peu nombreuses grâce à l'activité correctrice des ADN polymérase (activité exonucléasique 3' → 5'). Un agent mutagène augmente le taux de mutation au sein d'un génome (Pedrazzani *et al.*, 2012).

La capacité d'un agent à altérer directement ou indirectement le patrimoine génétique d'une cellule peut avoir lieu selon plusieurs mécanismes:

- Rupture d'une chaîne d'ADN
- Rupture de deux chaînes d'ADN : dégradation
- Modification des bases (Thymine, Cytosine, Adénine, Guanine)

Le tableau suivant montre les différents agents mutagènes avec quelques exemples et mode d'action.

Tableau I : les différents types d'agents mutagènes (Etine et *al.*, 2001)

	Type	Exemple
Agent biologique	VIRUS	HIV
Agent physique	Radiation ionisante ou non ionisante	<p>Les ultraviolets (UV) sont absorbés au niveau des bases pyrimidiques, provoquant un dimère et une distorsion au niveau de l'ADN (Vargs et <i>al.</i>, 2001).</p> <p>les rayons X et les rayons γ, génèrent des radicaux libres (OH⁻, hydroxyle), oxydent les bases azotées, ce qui induit des mutations.</p>
Agent chimique	certaines substances chimiques capables d'altérer la structure et la complémentarité des bases	<p>L'acide nitreux provoque la désamination de l'adénine, et provoque une transition, Dépurination,</p> <p>Les radicaux libres (ions surepoxydes, radicaux hydroxydes...) peuvent oxyder la guanine (appelé oxo guanine) qui peut s'apparier aussi bien avec de l'adénine qu'avec de la cytosine</p>

a) Dommages oxydatifs de l'ADN

L'attaque par les espèces réactives de l'oxygène est une source majeure de dommages à l'ADN (tableaux II) mais aussi aux autres biomolécules qui sont les lipides, les protéines et les glucides.

Les radicaux oxygénés ont des sources intra- et extracellulaires variées. La chaîne respiratoire mitochondriale constitue la source intracellulaire principale à travers laquelle une réduction monoélectronique de l'oxygène pourrait avoir lieu.

Les réactions peroxysomales et microsomales, le métabolisme associé à la phagocytose, certaines enzymes oxydantes et certaines réactions d'auto-oxydation sont d'autres sources endogènes d'espèces réactives de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 1999)

Tableau II : Réactivité avec l'ADN des espèces impliquées dans le stress oxydatif

Espèce réactive	Réaction avec l'ADN
$^1\text{O}_2^\bullet$	Oxyde la guanine
OH	Oxyde les bases et les sucres
H_2O_2	Oxyde l'adénine
$\text{O}_2^{\bullet-}$ et HO_2^\bullet	Pas de réactivité détectable
RO^\bullet et ROO^\bullet	Oxyde les sucres
O_3	Oxyde les bases
ONOO-	Oxyde les bases et les sucres
Radicaux cationiques purines et pyrimidines	Hydratation et déprotonation
Ions de type ferryl (fer(IV))	Oxyde les bases et les sucres

I.2 Les composés actifs d'origine végétale

Les composés qui participent directement à la survie de la plante sont appelés les métabolites primaires. Et d'autres composés actifs qualifiés de métabolites secondaires, regroupent les pigments, les arômes, les tanins. Ils contribuent à protéger la plante contre les pathogènes, champignons, rayonnement UV, etc. (Augustin et *al.*, 2003). Ces composés de structures chimiques extrêmement variées, sont souvent propres à une espèce ou à un groupe d'espèces et participe à l'identité chimique de la plante, ils ont des activités biologiques pharmacologiques d'intérêt pour l'Homme (Rong, 2010).

Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné. On distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes et les lignanes (Gorinstein et *al.*, 2007).

Ils protègent les végétaux contre les blessures (Massimo et *al.*, 2007), ils sont présents principalement dans les fruits, les légumes (Manach et *al.*, 2005) et possèdent de divers activités biologiques (Benkiki, 2006).

I.2.1 Classification

a) Les composés phénoliques ou polyphénols

Ils constituent l'un des groupes des métabolites les plus réponde du règne végétal avec pas moins de 5000 composés différents et largement distribués chez les végétaux. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (martin et *al.*, 2002). 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).

b) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation, plus de 4000 composés ont pu être identifiés (D'Archivio et *al.*, 2007). Leurs effets protecteurs cardiovasculaires ont été largement étudiés (Shuzhong et *al.*, 2005).

Ils sont divisés en fonction de leur variation structurel et degré d'oxydation en 5 grandes classes: flavanols et flavonols, anthocyanes, flavones, flavanones et chalcones (Erin et *al.*, 2010).

c) Les tanins

Les tanins sont des composés de structure polyphénolique solubles dans l'eau et ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 (Bernard, 2011). Ils protègent la plante contre les prédateurs (herbivores et insectes) (Bruneton, 1997).

Les tanins sont classés en deux catégories: les tanins hydrolysables (groupe principalement responsables des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes) (Seremel et *al.*, 2010), et les tanins condensés (ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques) (Kaur et *al.*, 2000).

d) Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent le groupe de substance d'intérêt thérapeutique dû à leurs activités pharmacologiques, se sont les plus importants en termes de nombre, de diversité structurale. Ils sont de structure souvent azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique (Bruneton, 2009).

Les alcaloïdes présents dans toutes les parties de la plante, ex : racines, feuilles, fruits, écorces, graines... (Hurabielle, 1981)

e) Autres composés**- Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses. Ils sont extraits de matières premières d'origine végétale, par distillation par la vapeur d'eau.

C'est un mécanisme de défense contre divers agresseurs (champignons, insectes, micro-organismes, herbivores) (Michel, 2011), aussi elles représentent une des stratégies pour attirer les insectes pollinisateurs. Les huiles essentielles sont, principalement, utilisées en raison de leurs propriétés odorantes d'une part, et de leurs propriétés médicinales (Michel, 2011).

- Les coumarines

Les coumarines sont synthétisées chez de nombreuses espèces, le plus souvent sous forme de glucosides, après une invasion parasitaire (Hopkins, 2003).

- Acide phénolique

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non-flavonoïdes, ils sont incolores et se divisent en deux groupes : les acides cinnamiques et les acides benzoïques.

Les acides benzoïques, comme l'acide gallique, se trouvent dans très peu de plantes consommées par l'Homme. (Massimo et *al.*, 2007).

Plusieurs activités biologiques ont été évaluées et sont très exploitées ces dernières années, parmi elles l'activité mutagénique et antimutagénique. Pour évaluer ces activités, plusieurs tests ont été mis au point.

1.3 Activité mutagénique et antimutagénique

La mise au point des tests d'études de l'activité génotoxique/anti-génotoxique des extraits préparés à partir de plantes médicinales est en développement.

L'anti-mutagenèse est définie comme étant la diminution en réponse à des facteurs exogènes, du taux des mutations spontanées ou induites. Les antimutagènes sont des substances animales, végétales ou synthétiques capables d'inhiber ou de réparer les lésions d'ADN, ils sont souvent des anticarcinogènes (Pedrazzani et *al.*, 2012).

I.3.1 Méthodes d'étude de l'activité mutagénique et antimutagénique :

- Test de Ames

Ce test biologique fut décrit en 1973 par Bruce Ames. C'est un test biologique permettant de déterminer l'activité mutagénique et antimutagénique des extraits et des composés chimiques (Knezevic et *al.*, 2005).

Le test utilise des souches mutantes de *S. typhimurium* auxotrophes pour l'Histidine. La croissance des colonies dans un milieu minimum aura lieu si une réversion de la mutation se

produit (Maron et *al.*, 1983; Fratianni et *al.*, 2006). Un test complémentaire est réalisé pour évaluer l'activité mutagénique des métabolites de la substance testée, en incubant les cellules bactériennes en présence d'un extrait de foie de rat. Les cellules auxotrophes pour l'histidine pousseront quelques heures jusqu'à épuisement de l'histidine du milieu. Seules les révertants, ayant retrouvé la capacité à synthétiser l'histidine, seront ensuite capables de se développer sur ce milieu minimum (Etienne et *al.*, 2001). L'activité anti-mutagénique est évaluée en incubant un mutagène de référence avec la substance à tester, cette dernière est anti-mutagénique si elle inverse l'effet mutagénique de la substance de référence.

principalement résultant de la recombinaison mitotique homologue interchromosomiques entre les deux chromosomes X des génotypes femelles. Le test de la mosaïque des yeux w/w détecte un large éventail de modifications de l'ADN (Vogel et *al.*, 1993).

Ce test a été très utilisé dans l'analyse d'un grand nombre de produits chimiques avec différents mécanismes d'actions, avec une grande capacité de détecter les effets mutagènes et antimutagènes (Vogel et *al.*, 1993).

- Test de Comet

Le test de comet (ou "single cell gel electrophoresis assay") est une technique micro-électrophorétique, permettant la visualisation directe des dommages de l'ADN, cette technique de plus en plus utilisée dans le dépistage de la génotoxicité dans les tests *in vitro* en raison de sa grande sensibilité et spécificité (Carla et *al.*, 2012). Cette technique est rapide permet d'estimer les dommages et la réparation de l'ADN *in vivo* et *in vitro* par électrophorèse dans les cellules eucaryotes ou procaryotes (Verschaeve et *al.*, 1995).

L'analyse se fait sur des cellules incluses dans un gel d'agarose, auxquelles on applique un traitement aboutissant à la perméabilisation de leurs membranes par des détergents, et à l'extraction des protéines nucléaires sous l'action de sels à fortes concentrations. L'ADN se trouve alors réduit à une structure "pseudo-nucléaire" (Mckelvey-martin et *al.*, 1993).

Suite à cette lyse, l'ADN est mis au contact avec une solution permettant son déroulement. L'ADN ainsi préparé est ensuite placé dans un champ électrophorétique, les molécules d'ADN intactes vont migrer sous l'effet du champ électrique, et vont donc décrire une sphère compacte. Un ADN endommagé va, voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère, formant ainsi un "halo" (Figure) (Mckelvey-martin et *al.*, 1993).

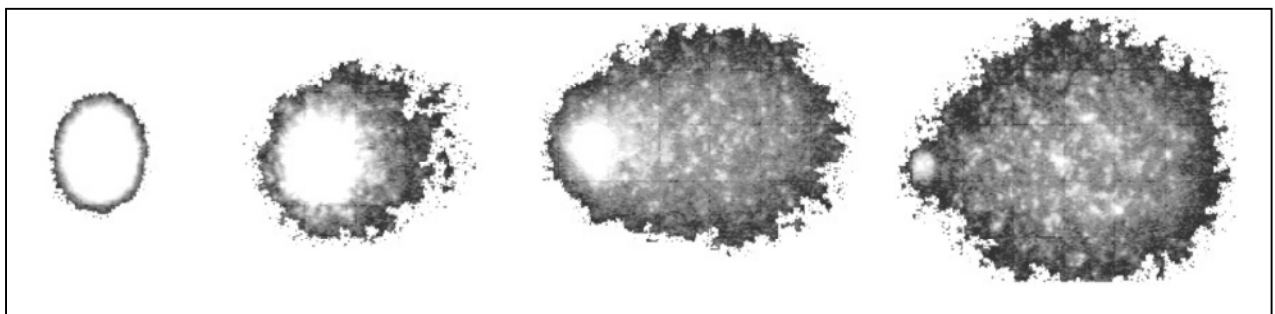


Figure 2 : Cellules présentant différents niveaux de dommages mis en évidence par le test des comètes. De gauche à droite : dommages croissants.

- ***Allium cepa* test**

Les plantes supérieures sont reconnues comme d'excellents modèles génétiques pour détecter des agents mutagènes. *A. cepa* a été considérée comme espèce favorable pour évaluer les anomalies chromosomiques et perturbations dans le cycle mitotique, en raison de la taille des chromosomes qui est en nombre réduit ($2n = 16$) (Fiskesjo et al., 1985; Nielsen et al., 1993; Feretti et al., 2007).

Ce test a été utilisé pour évaluer les dommages de l'ADN et la perturbation du cycle cellulaire en présence d'une substances tel qu'un extrait de plante (Leme et al., 2009; Elsevier et al., 2009).

Le test *A. cepa* permet également l'évaluation des différents critères. Parmi les critères d'évaluation, les aberrations chromosomiques ont été les plus recherchées pour détecter la génotoxicité de la substance. L'indice mitotique et certaines anomalies nucléaires sont utilisés pour évaluer et analyser la cytotoxicité et la mutagénicité des produits chimiques différents. (Rank, 2003; Leme et al., 2009; Kwan et al., 2012; solange et al., 2012).

- **Test des micronoyaux**

Le test micronoyau *in vitro* est un système de détection des produits qui induisent la formation de petites membranes des fragments d'ADN liés aux micronoyaux dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ces micronoyaux peuvent provenir à partir de fragments acentriques ou chromosomes entiers qui ne peuvent pas migrer avec le reste des chromosomes au cours l'anaphase de la division cellulaire (Fenech, 2000).

Le but du test du micronoyau est de détecter les agents qui modifient la structure des chromosomes et la ségrégation et leur capacité à induire des micronoyaux dans les cellules en interphase.

Ces différents tests ont été utilisés pour évaluer l'activité mutagénique et antimutagénique de certaines plantes, cette activité est due à la présence de composés actifs (knezevic et al., 2005).

I.3.2 Activité mutagenique et antimutagenique des composés d'origine végétale

L'intérêt métabolique porté sur les composés actifs des plantes fait à l'heure actuelle, l'objet d'un grand nombre de travaux, grâce à leurs excellentes propriétés biologiques telles que l'activité anti-oxydante (Hadi, 2004) l'activité anti-inflammatoire (Matés et *al.*, 2001) et anti-cancérogène (Mouria et *al.*, 2002) (figure 3).

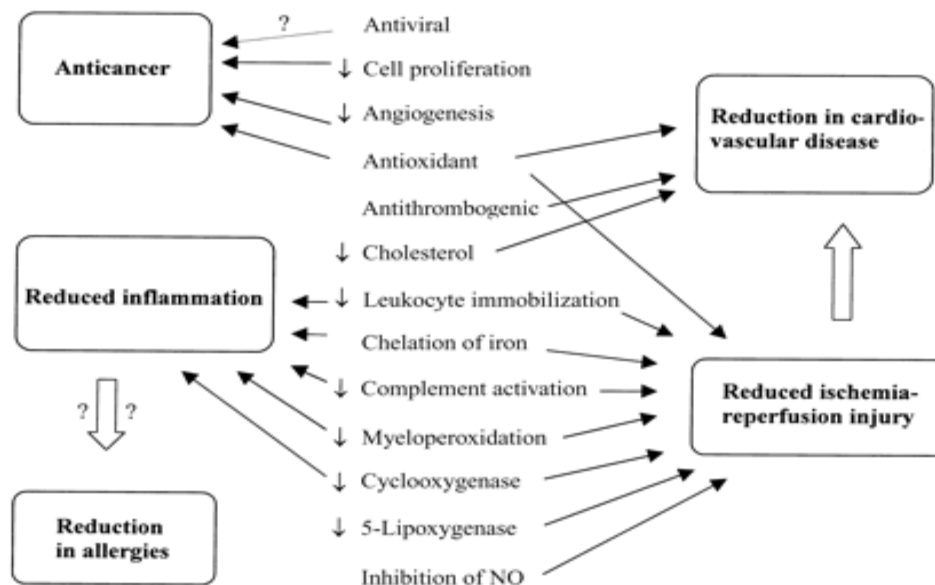


Figure 3: les activités biologiques des composés naturels (Hadi, 2004)

Plusieurs études se sont intéressées à la détermination de l'activité mutagénique et antimutagénique des composés actifs extraits de plantes médicinales dans le but de substituer les effets secondaires de la chimiothérapie.

Certaines études épidémiologiques, en utilisant plusieurs modèles ont également signalé que la consommation de produits végétaux est associée à une diminution de risque de plusieurs maladies chroniques, y compris le cancer (Kris-Etherton et *al.*, 2002).

Il existe de nombreuses publications traitant les propriétés pharmacologiques des extraits de plantes, une étude sur les extraits d'avoine, de sarrasin, de sergho, le millet japonais et de blé a montré leurs effets anti-mutagénique. De forte corrélation ont été enregistrées entre les activités anti-mutagénique et la teneurs en composés phénoliques (Dar Ikram, et Fakouhi, 1976; Brindzová et *al.*, 2009).

Il a été rapporté que les aliments contenant de grandes quantités de molécules comme les polyphénols (flavonoïdes, isoflavones, catéchines), les composés sulfurés (isothiocyanates, diallyl sulphides) et les terpènes (caroténoïdes, monoterpènes) possèdent des propriétés thérapeutiques anticancéreuses (Béliveau, 2005).

Hadi (1994) a signalé que l'acide tannique à concentration élevée, pourrait provoquer une cassure de l'ADN des cellules du thymus de veau. En revanche, il a été démontré que l'acide tannique peut augmenter la résistance des lymphocytes contre des lésions d'ADN induites par des mutagènes alimentaires (Wu et al., 2004). Dans une autre étude, des extraits éthanoliques de *Alchemilla SP* et *Potentilla Anserina* riches en tannins ont montré une activité antimutagénique (Kaur et al., 2000).

Le tableau suivant regroupe certaines études ayant évalué l'activité mutagénique et anti-mutagénique en utilisant plusieurs tests :

Tableau III : l'évaluation de l'activité mutagénique et antimutagénique de différentes plantes.

plante	Extrait	Activité mutagénique et antimutagénique	Test	Références
<i>Punica granatum</i>	hydro-alcoolique	Activité mutagénique IC ₅₀ ≥ 70 mg/kg	Test de Ames	S´anchez et al., 2008
<i>Azadirachta indica</i> <i>Morinda lucida</i> <i>Cymbopogon citratus</i> <i>Mangifera indica</i> <i>Carica papaya</i>	Extraits aqueux	Activité mutagénique (0.6 % à 2.6 %)	Test <i>Alium cepa</i>	Akinboro et al., 2007
Amarathus L <i>Sorghum bicolor</i> Echinochloa L	Extrait éthanolique	Activité antimutagenique (25-40 %)	Test de Ames	Brindzová et al., 2010
Brassica	Extrait Jus brut de fruit	Activité mutagénique 70-80 %	Test de Ames	Fekadu et al., 1996
<i>Solanum lycocarpum</i>	Extrait alcaloïdique des Fruits	Activité antimutagénique (40% à 52%)	Test de comet	Carla et al., 2012
Nauclea Plante	Extrait de l'écorce	activité génotoxique (50%)	Test des comèt	Liua et al., 2011
Cassia Angustifolia Vahl	extrait aqueux	Activité mutagénique (15%)	Test de Ames	Silva a et al., 2008
<i>Zuccagnia punctata</i>	Extraits hydroalcooliques	Activité antigénotoxique (28,2 à 43,9%)	Test de comet	Zampini et al., 2008

- Mécanisme d'action de composés phénoliques :

Plusieurs études ont élucidé les mécanismes anti-mutagène de plusieurs composés appartenant aux différentes classes, les acides phénoliques, les alcaloïdes et les flavonoïdes. Il a été rapporté que ces derniers ont agi au niveau de différents stades du cycle cellulaire:

- Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de pro-carcinogènes, ou en stimulant la réparation des ADNs mutés (Brindzová et *al.*, 2010).
- Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents supprimeurs de tumeurs (Augustin Scalbert et *al.*, 2003).

Plusieurs mécanismes d'action contre le cancer ont été identifiés pour les isoflavone/flavones qui peuvent agir selon plusieurs mécanismes:

- induction de l'arrêt du cycle cellulaire et apoptose,
- prévention de l'oxydation et induction des enzymes antioxydantes
- régulation du système immunitaire et modification de la signalisation cellulaire.

La combinaison de ces mécanismes peut être responsable de la prévention du cancer par ces composés (Birt et *al.*, 2001).

Les stilbénes, tel le resvératrol, *in vitro*, ont montré une action inhibitrice sur les trois phases principales de la cancérisation : initiation, promotion et propagation. Il a même été montré que ces molécules agissent de façon préventive contre certaines forme de cancer, par l'inhibition d'expression de gènes des protéines kinase C (Berké et *al.*, 2003).

L'activité anti-tumorale de la catéchine présente dans tous les types de thé (Bracke, 1991) est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver le T-PA (tissue-type plasminogen activator).

La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (Larocca, 1994).

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène (Scutt, 1987; Makimura, 1993), l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres (Di Carlo, 1999).

Les produits antioxydants peuvent réduire la Protéine kinase A. la forme réduite de la PKA va transloquer vers la membrane ou elle phosphoryle le facteur de transcription C/EBP β . C/EBP β sera transloqué vers le noyau ou il induit la transcription de p21WAF1/CIP1 dans une voie indépendante du p53.

L'induction de p21WAF1/CIP1 résulte dans l'inhibition de CDK-2 et un arrêt de la croissance des cellules en phase G1. p21WAF1/CIP1 se lie aussi à JNK-1 et inactive les protéines kinase

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Produits chimiques

Acide acétique 45%, Ethanol 96%, HCl 1N, diméthyl suloxide (DMSO), Azide de sodium, Sels minéraux (CaSO₄, MgSO₄, NaHCO₃, KCl), Carmin.

II.1.2 Autres matériels

- Broyeur de marque IKA
- Tamis de marque RETSCH, avec diamètre 63µm
- Etuve de marque BENDER et ECOCELL
- Balance analytique de marque RADWAG
- Bain marie de marque MEMMERT
- Sonicateur de marque RAYPA
- Vortex de marque VELP
- Centrifugeuse de marque SIGMA
- Microscope optique de marque ZEISS avec grossissement x 100
- Une loupe optique de marque ZEISS

II.1.3 Matériel végétal

Pour la fiabilité d'un test de gènotoxicité, il est important d'utiliser des espèces présentant l'avantage de pouvoir être manipulées, des espèces de petite taille et d'une sensibilité élevée. *Allium cepa* a été choisies pour l'évaluation de l'activité gènotoxique et anti-gènotoxique des extraits de deux plantes médicinales locales.

a. Allium cepa

Le genre *Allium* est diploïde ($2n=16$) (Silué et al., 2003), comprend environ 550 espèces. L'oignon (*A. cepa*) est l'espèce la plus connue du genre *Allium*. Aujourd'hui *A. Cepa* est cultivé partout dans le monde, en particulier dans les climats tempérés (Breu, 1996).

Les oignons utilisés dans notre étude sont d'environ 3 à 5 cm de diamètre de couleur violet clair à foncé, achetés dans des marchés locaux.

- **Classification (*Allium cepa*)** (Breu, 1996)



Règne	plantae
Sous règne	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Liliales
Famille	Alliacées
Genre	Allium
espèce	<i>allium cepa</i>

- **Description des plantes à tester**

Deux plantes médicinales ont été sélectionnées pour évaluer leurs activités gènotoxique et anti-gènotoxique, *Populus nigra* et *Ulmus campestris*.

b. *Populus nigra*

Le peuplier noir, *Populus nigra* appartient à la famille botanique des Salicacées. Cet arbre peut atteindre 20 à 25 mètres, croît communément sur les terrains humides, son besoin en eau est très important. Ses feuilles sont alternes, stipulées, simples à longs pétioles. Les peupliers produisent des bourgeons qui se récoltent à partir de février. Ils sont de forme ovoïde aiguë, légèrement courbés, glabres, brun clair. L'exsudât, a été particulièrement étudié pour sa composition chimique.

- Classification : (Beloued, 2008).



Régne	Plantae
Ordre	Salicales
Famille	Salicacées
Genre	Populus
Espèce	<i>Populus nigra</i>

- Principes actifs

Les bourgeons contiennent des acides phénoliques et des flavonoïdes. Leurs acides caféique et p-coumarinique ont d'importantes propriétés antioxydants (Goetz, 2011).

- Propriétés thérapeutiques

Peuplier noir aurait des propriétés antirhumatismales et anti-inflammatoires, un effet antiseptique et astringent (Beloued, 2008).

c. *Ulmus campestris*

L'orme champêtre est un arbre de 20 à 25m de hauteur à cime bien fournie, tronc très rugueux, feuilles alternés ovale de 7cm de long sur 3cm de large. Les fleurs sont petites, rougeâtre, presque sessiles. Les fruits sont des akènes ailes (samares). Son époque de floraison est en mars et avril. Il est largement distribué dans toutes les zones tempérées, et est répartie dans le sud et l'est de l'Europe et l'Afrique du nord (Algérie, Tunisie et Maroc) (Belouaed, 2001).

- Classification (Belouaed, 2001).



Règne	plantae
Ordre	Urticales
Famille	Ulmacées
Genre	Ulmus
Espèce	<i>Ulmus campestris</i>

- Principes actifs

L'écorce de l'orme et ses feuilles sont riches en tanins et en mucilages (Debuigne et Couplan, 2009).

- Propriétés thérapeutiques

L'écorce intérieure de l'orme ou bien la seconde écorce et ses feuilles possèdent des propriétés stimulantes, sudorifiques, diurétiques et émollientes et elles sont utilisées contre la diarrhée, rhumatisme, les maladies de la peau et les inflammations de la cavité buccale et du larynx (Beloued, 2001).

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation des extraits

Les bourgeons de *Populus nigra* ont été récoltés et échantillonnés en mois de mars, et l'écorce de *Ulmus campestris* en mois de septembre. Les deux parties ont été récoltées dans la forêt d'Azrou nbechar de la région d'Amizour située à l'est de Bejaia. Ces parties ont été séchées à l'étuve (37 °C), afin d'éliminer toute trace d'humidité.

Une fois secs, les bourgeons de *Populus nigra* et l'écorce de *Ulmus campestris* ont été broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre inférieure à $63\mu\text{m}$. Le produit final a été préservé dans des flacons en verre fermés et stockés à l'abri de la lumière, jusqu'à l'extraction qui est réalisée comme suit :

600g de poudre de *Populus nigra*, et 400g de poudre de *Ulmus campestris*, ont été macérés dans de l'éthanol (95%) avec un rapport de 1 :6 (P/V) et 1 :4 (P/V) respectivement.

Les mélanges ont été laissés sous agitation pendant 24h, suivie d'une décantation pendant 24h. Le surnageant récupéré a été centrifugé à 1500g pendant 15min, puis séché à l'aire libre et à une température ambiante

Après évaporation totale, les résidus sec ont été conservés à -4°C .

II.2.2 Evaluation de l'activité gènotoxique et anti-gènotoxique

a. Préparation des échantillons (bulbes)

Les bulbes d'oignons ont subi des traitements avant tout test de gènotoxicité, les étapes sont comme suit:



Figure 5 : bulbes d'oignon (les premières étapes de l'expérience)

a)et c) dans le milieu de culture /b) les racines des bulbes après 48h de culture

- enlever la première couche des bulbes, et couper les racines pour permettre la poussée de nouvelles racines
- rincer les extrémités des bulbes avec l'eau potable.

- Les extrémités des bulbes ont été immergées dans des milieux de cultures et ont été incubées pendant 48h à 25°C. Le milieu de culture a été changé quotidiennement, la longueur des racines des bulbes d'oignon a été mesurée (en mm) avec un pied à coulisse électronique avant et après le traitement avec les solutions tests: *P. nigra* (100 et 300 µg/ml), *U. campestris* (100 et 300 µg/ml), Azide de sodium (50, 100 et 300 µg/ml).

b. Méthode d'étude

La méthode appliquée s'accorde avec celle de, Rank et ses collaborateurs (1997), avec quelques modifications. Pour le test *Allium cepa*, 13 groups de sept bulbes ont été placés dans un milieu de culture riche en minéraux pour l'enracinement, les contrôles restent dans le même milieu de culture ou le milieu de culture additionné de DMSO (0.5%), les milieux ont été renouvelés chaque 24h, alors que les autres groupes ont subi des traitements dépendants du test à réaliser.

b.1- Effets des extraits et de l'azide de sodium sur le cycle cellulaire de *Allium cepa*

Sept groupes, ont été utilisés pour l'évaluation du test de cytotoxicité, et la génotoxicité des extraits à tester. Après une croissance de nouvelles racines atteignant les 2cm de longueur, les bulbes ont été déplacées dans des milieux différents contenant 100, 300 µg/ml d'extrait de bourgeons ou d'extrait d'écorce dissous dans du DMSO (0.5%). Trois autres groupes de bulbes ont été cultivés dans un milieu contenant un agent mutagène Azide de sodium à différentes concentrations 50, 100 et 300µg/ml.

b.2- Evaluation de l'activité anti-génotoxique des extraits

Les quatre autres groupes ont été utilisés pour évaluer l'activité anti-mutagénique des extraits contre des mutations induite par l'azide de sodium à 100µg/ml. Ainsi les bulbes ont été placées dans des milieux contenant l'agent mutagène (100µg/ml) et les extraits à 100 et 300µg/ml.

Une moyenne de six lames a été préparée pour chaque bulbe et chaque traitement, les extrémités des racines de chaque bulbes ont été hydrolysées dans du HCl 1N pendant 10min.

La région méristématique des extrémités des racines était fragmentée et colorée avec le carmin 2% en utilisant la technique d'écrasement (Bagatini et *al.*, 2008).

Le nombre total moyen des cellules analysées par bulbe était de 1000 cellules. Les lames ont été analysées par observation des cellules en interphase, prophase, métaphase, anaphase et télophase en utilisant un microscope optique avec un objectif x40. La moyenne des cellules dans chaque phase du cycle de division d' *A.Cepa* et le pourcentage de l'indice mitotique ont été calculés comme suit : (nombre de cellules en division / le nombre total de cellules) x100.

II.3 Analyse statistique

Tous les résultats sont la moyenne \pm SEM (n=7). Les résultats obtenus ont été analysés en utilisant logiciel STATISTICA. Les différences sont significatives à $p<0.05$.

III. Résultats et discussion

III.1 Résultats

III.1.1 Résultats macroscopiques

a) Effets des extraits et du mutagène sur la croissance des racines de *A. Cepa*

La longueur des racines mesurée et leur aspect observé à l'œil nu ont été rapportés pour les bulbes dont les racines ont été immergées dans les milieux contenant l'azide de sodium: 50, 100 et 300 µg/ml; les extraits de bourgeons de *P.nigra* et *U.campestris* : 100 et 300 µg/ml et les résultats sont représentés dans les figures 6, 7 et 8, respectivement.

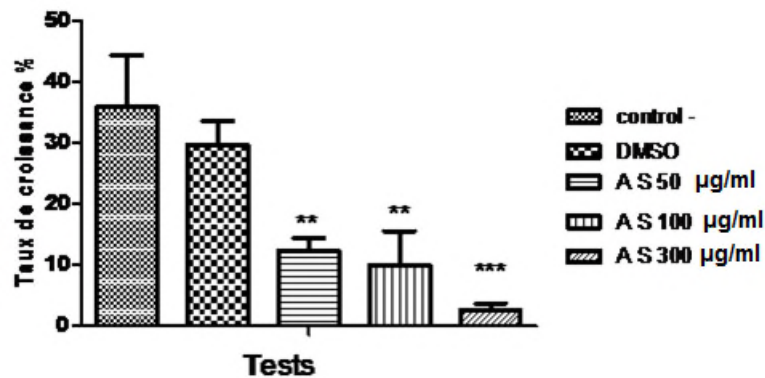


Figure 6 : L'effet de l'Azide de sodium sur le taux de croissance des racines de *Allium cepa*

Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle.

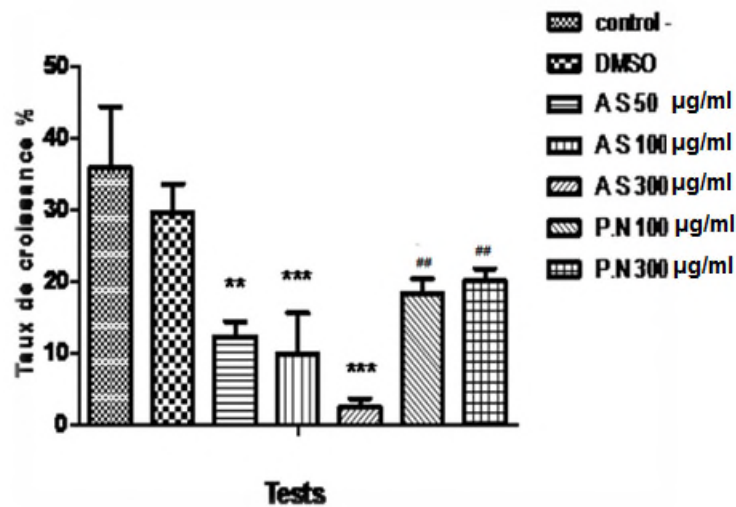


Figure 7: L'effet de l'Azide de sodium et de l'extrait de *P. nigra* sur le taux de croissance des racines

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à *p<0.05; **p<0.01 et ***p<0.001 par rapport au groupe contrôle.

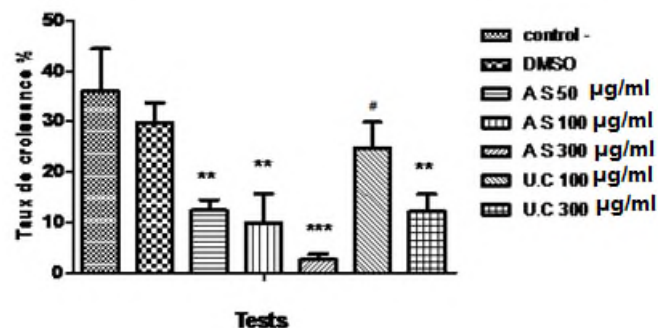


Figure 8: L'effet de l'Azide de sodium et de l'extrait de *U. campstris* sur le taux de croissance des racines.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à *p<0.05; **p<0.01 et ***p<0.001 par rapport au groupe contrôle.

Les résultats ont révélé que le mutagène à 50, 100 et 300µg/ml a très significativement diminué le taux de croissance (p<0.01) (12,37±2,08; 9,94±5,68; 2,57±1,16%) respectivement

par rapport au contrôle ($35,98 \pm 8,47\%$). Une fragilité des racines a été observée au niveau des bulbes traités par l'agent mutagène à différentes concentrations.

Aucune différence significative n'a été observée entre le taux de croissance des racines traitées avec l'extrait de *Populus nigra* et le groupe contrôle ($p < 0.01$). L'extrait de *U. campestris* à $100 \mu\text{g/ml}$ n'a aucun effet sur le taux de croissance ($p < 0.01$) des racines, par contre à $300 \mu\text{g/ml}$ il a réduit le taux de croissance de manière très significative par rapport au contrôle ($P < 0,01$), cette réduction est comparable à celle engendrée par le mutagène à $50 \mu\text{g/ml}$ car aucune différence n'a été observée entre le groupe traité avec *U. campestris* à $300 \mu\text{g/ml}$ et le taux de croissance calculé pour les racines de bulbes traitées avec l'azide de sodium à une dose de $50 \mu\text{g/ml}$.

b) Effets des extraits sur la croissance des racines de *A. Cepa* traitées avec l'azide de sodium

Dans le but d'évaluer le potentiel anti-mutagénique de l'extrait, les racines de *A. cepa* ont été incubées dans un milieu contenant le mutagène ($100 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait à 100 et $300 \mu\text{g/ml}$. Le taux de croissance calculé pour les groupes traités avec l'azide de sodium et l'extrait de *P. nigra* ou *U. campestris* ont été comparés au contrôle et au groupe traité avec le mutagène seul, les résultats sont montrés dans les figures 9 et 10, respectivement.

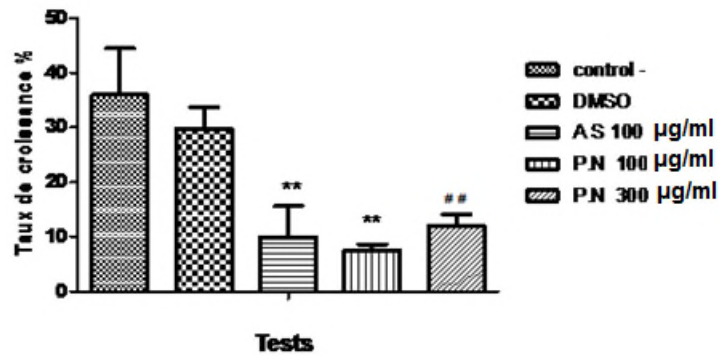


Figure 9: L'effet de l'extrait de *P.nigra* sur le taux de croissance des racines prétraitées avec l'azide de sodium à 100µg/ml

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p<0.05$; ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ par rapport au groupe contrôle. Les différences sont significatives à # $p<0.05$; ## $p<0.01$ et ### $p<0.001$ par rapport au groupe traité avec le mutagène.

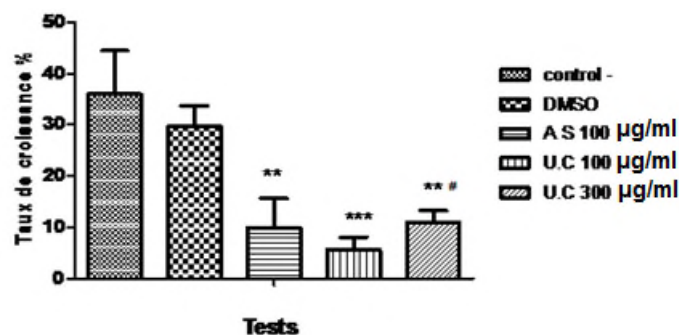


Figure 10: L'effet de l'extrait de *U. campestris* sur le taux de croissance des racines prétraitées avec l'azide de sodium à 100µg/ml

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ par rapport au groupe contrôle. Les différences sont significatives à # $p<0.05$; ## $p<0.01$ and ### $p<0.001$ par rapport au groupe traité avec mutagène.

Les résultats ont montré que la réduction du taux de croissance provoquée par l'Azide de sodium a été inversée par l'extrait *P.nigra* à 300µg/ml car une différence très significative ($P<0,01$) a été trouvée entre le taux de croissance enregistré chez le groupe traité par l'azide

seul (9.94%) et le groupe traité par la combinaison de *pupulus* a 300µg/ml et l'azide a 100 (12.07%). A 100µg/ml aucune différence n'a été observée avec le groupe mutagène. *U.campestris* à 100µg/ml n'a aucun effet sur la réduction du taux de croissance provoquée par l'azide de sodium, alors qu'une différence significative ($P<0,01$) a été trouvée entre le taux de croissance enregistré au niveau du groupe traité par l'azide seul et le groupe traité par le mutagène et l'extrait *U.campestris* à 300µg/ml.

III.1. 2 Effet des extraits et du mutagène sur le cycle de *Allium cepa*

La cytotoxicité/génotoxicité des extraits ont été évaluées en utilisant *Allium cepa* test. Le nombre total des cellules analysées, le nombre de cellule en interphase et dans les différentes phases du cycle cellulaire de *A.cepa* sont présentés dans le tableau IV.

Le Tableau IV montre que le pourcentage des cellules en interphase augmente en présence du mutagène, alors que de faibles pourcentages de cellules en division ont été enregistrés. Pour évaluer le potentiel mutagénique de l'Azide de sodium et l'activité anti-mutagénique des extraits testés, l'indice mitotique caractéristique de chaque groupe a été calculé et représenté dans les figures 11, 12 et 13. La figure 11 montre que le mutagène à différentes concentrations (50, 100, 300 µg/ml) a réduit l'indice mitotique de façon très significative ($p<0.01$). Cet effet est dépendant de la concentration du mutagène.

Une réduction très significative ($P<0,01$) de l'indice mitotique en présence des extraits de plante comparé au contrôle a été aussi enregistrée. Les extraits de *Populus nigra* et de *Ulmus campestris* à différentes concentrations (Figure 12 et 13) n'ont montré aucune activité mutagénique significative, car des différences très significatives ($p<0.01$) ont été enregistrées entre l'indice mitotique calculé en présence de l'extrait et celui calculé chez le groupe traité par l'azide de sodium.

Tableau IV: le nombre de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire de racine de *Allium cepa* observées chez les différents groupes expérimentaux.

Groupe concentrations	Nombre cellules	% cellules interphase	% cellules prophase	% cellules métaphase	% cellules anaphase	% cellules télophase
Contrôle	1062	35.98±0.79	56.67±1.28	2.56±0.39	2.76±0.45	2.03±0.36
DMSO	1052	38.08±1.17	52.01±0.78	3.45±0.61	3.87±0.68	2.59±0.31
Mutagène 50	1080	57.62±0.70	41.04±0.68	0.77±0.13	0.21±0.06	0.28±0.07
Mutagène 100	1090	64.92±4.41	33.43±3.96	0.77±0.36	0.09±0.05	0.30±0.11
Mutagène 300	1114	77.64±1.20	20.85±0.99	0.39±0.10	0.09±0.04	0.44±0.14
Populus 100	1027	45.67±1.17	44.62±1.39	3.63±0.56	3.61±0.44	2.48±0.23
Populus 300	1050	47.12±1.36	46.73±1.32	2.19±0.35	2.23±0.53	1.73±0.24
Populus 100 +Azide 100	1046	55.68±1.23	42.57±1.23	0.80±1.16	0.37±0.11	0.46±0.09
Populus 300 +Azide 100	1073	43.88±1.78	53.85±1.72	1.22±0.24	0.45±0.16	0.60±0.24
Ulmus 100	1060	52.10±1.77	43.83±1.81	1.46±0.19	1.35±0.14	0.91±0.07
Ulmus 300	1071	53.25±1.91	42.42±1.83	1.31±0.36	1.23±0.23	1.31±0.26
Ulmus 100 +Azide 100	1053	63.10±1.82	35.59±1.46	0.46±0.12	0.19±0.07	0.45±0.16
Ulmus 300 +Azide 100	1108	58.62±1.72	39.68±1.61	0.74±0.10	0.51±0.10	0.45±0.11

1-Les valeurs sont les moyennes + SEM, test LSD ou comparaison planifié (n=7)

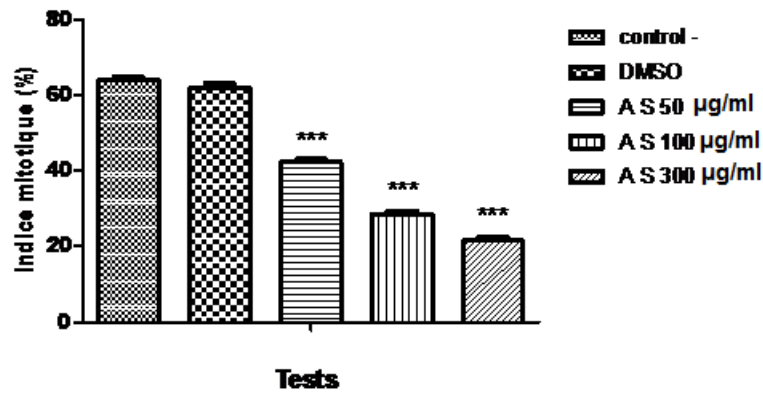


Figure 11 :l'effet de l'azide de sodium sur l'indice mitotique de *Allium cepa*

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle.

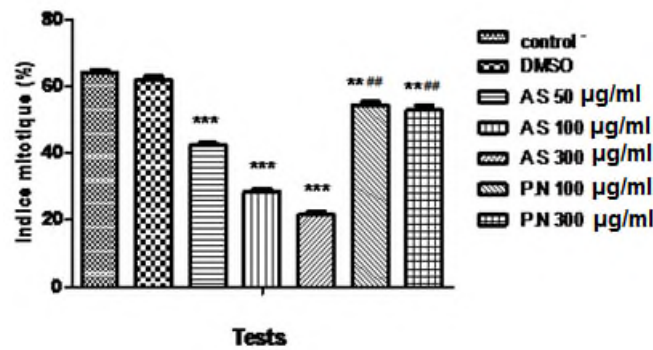


Figure 12 :l'effet de l'extrait de *P.nigra* sur l'indice mitotique.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle. Les différences sont significatives à # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ par rapport au groupe traité avec le mutagène.

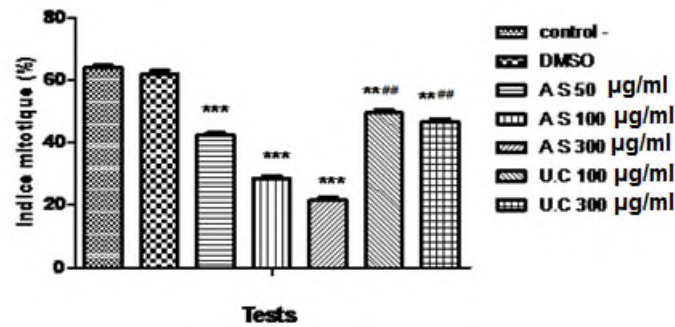


Figure 13 : l'effet de l'extrait de *U.campstris* sur l'indice mitotique.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle. Les différences sont significatives à # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ par rapport au groupe traité avec le mutagène.

L'action anti-mutagénique a été également évaluée en calculant l'indice mitotique des groupes traités avec la combinaison Azide de sodium et l'extrait de plante. Les résultats sont représentés dans les figures 14 et 15.

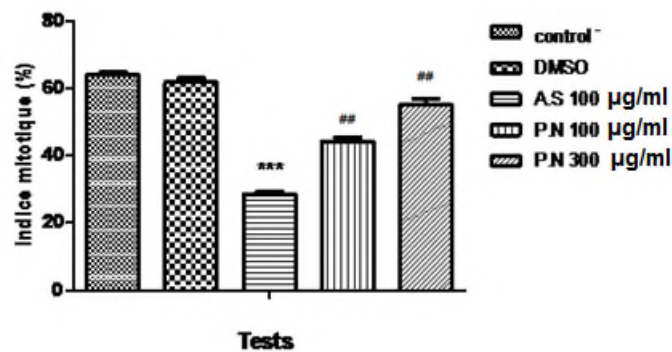


Figure 14: Effet antimutagénique de l'extrait de *P.nigra* sur l'indice mitotique.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle. Les différences sont significatives à # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ et ### $p < 0.001$ par rapport au groupe traité avec mutagène.

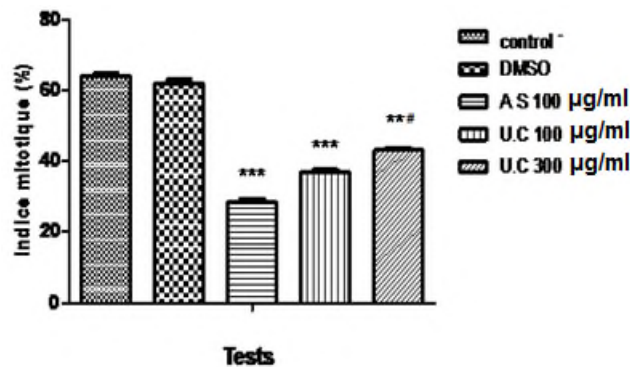


Figure 15: Effet anti-mutagenique de l'extrait de *U.campestris* sur l'indice mitotique.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne±SEM, 7 bulbes dans chaque groupe. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel statistica en utilisant le test ANOVA-MANOVA. Les moyennes sont comparées par le test LSD. Les différences sont significatives à * $p<0.05$; ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ par rapport au groupe contrôle. Les différences sont significatives à # $p<0.05$; ## $p<0.01$ et ### $p<0.001$ par rapport au groupe traité avec mutagène.

La figure 14 montre que l'extrait de *P.nigra* (100, 300 µg/ml) a augmenté de façon très significative l'indice mitotique ($p<0.01$) par rapport au groupe traité par l'Azide de sodium (100µg/ml), cette augmentation est dose-dépendante.

Aucun effet significatif sur la réduction de l'indice mitotique induit par le mutagène n'a été enregistré chez le groupe traité par l'extrait de *Ulmus campestris* à 100µg/ml (Figure 15).

Parmi les cellules analysées ($n=1000$), plusieurs types d'anomalies cellulaires ont été observés dans les groupes expérimentaux. Les différents cas d'aberration observés ainsi que les divisions normales sont représentés dans (Figure 16 (a) et (b)). Des mouvements et des orientations anormaux tels que des anaphases multipolaires, des blocages et des cassures ont été trouvés.

Le pourcentage des aberrations trouvé au niveau des cellules analysées dans chaque groupe expérimental a été calculé et résumé dans le tableau V.

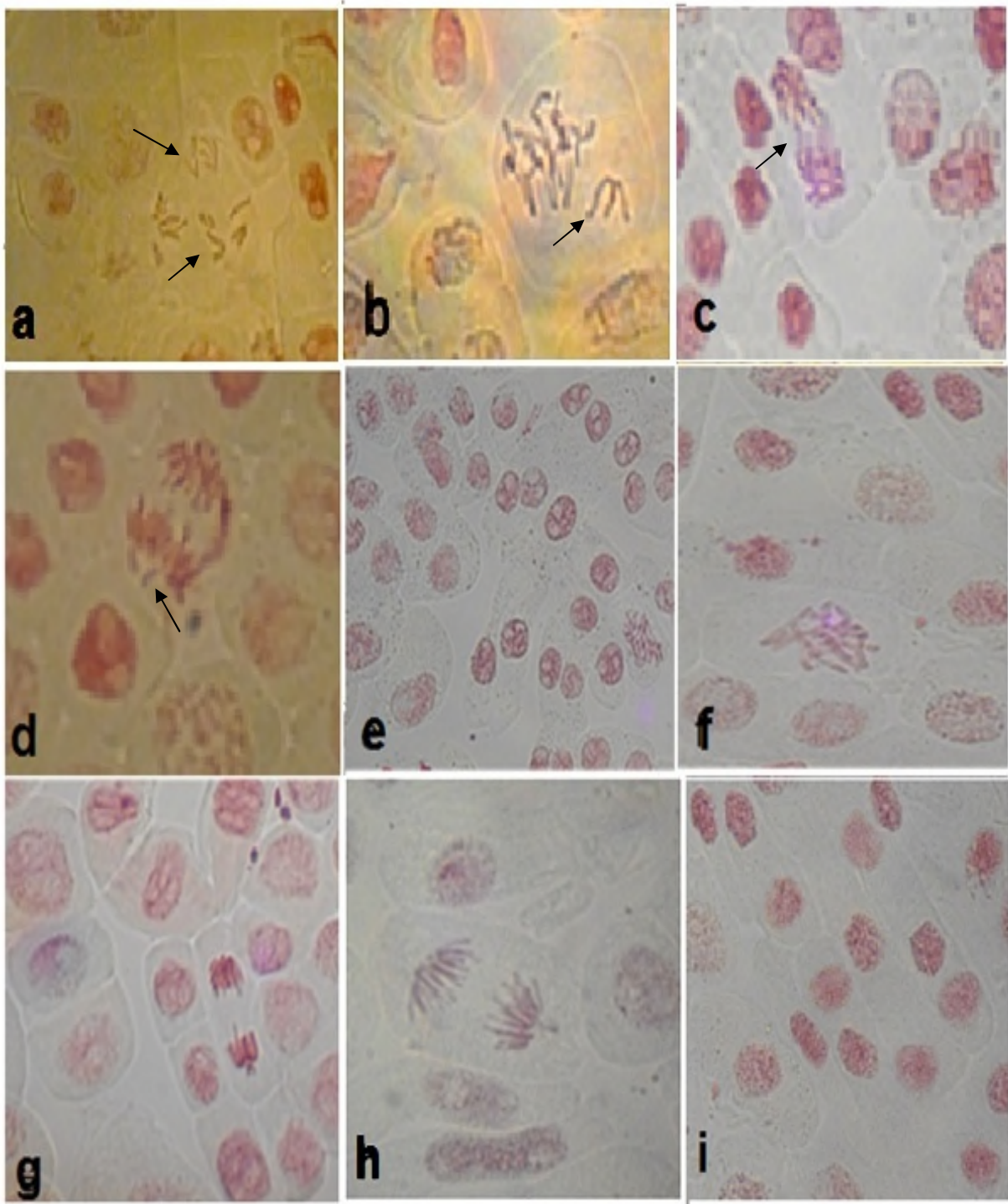


Figure 16 a: Les différentes cellules de *Allium cepa* observées en présence de différents traitement (original) a : mutlipolaire ; b : chromosome isolé; c : pontage; d : cassure; e : blocage de division ; f : c-mitose ; g : telophase normal; h : anaphase normal ; i : blocage

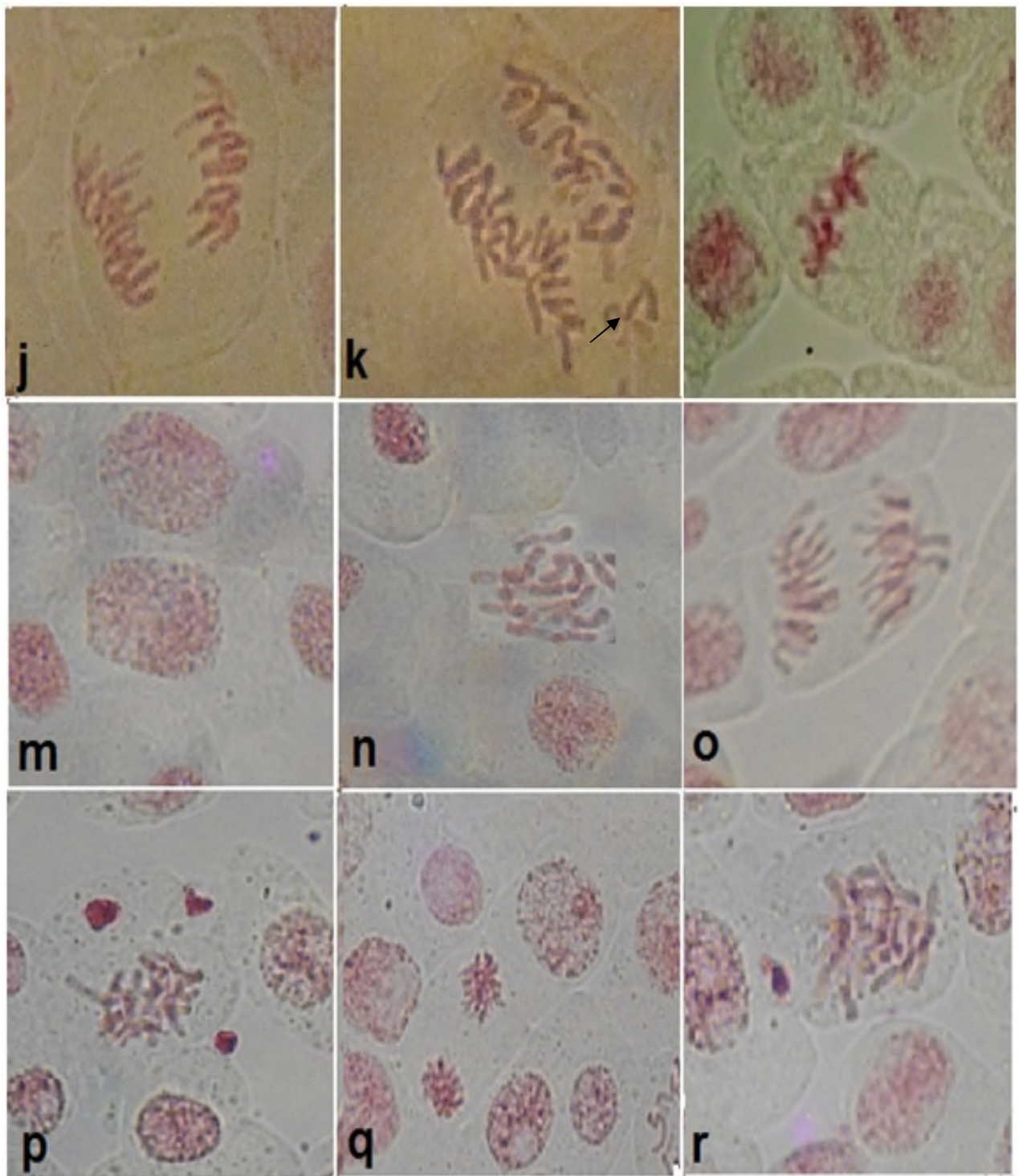


Figure 16 b: les différentes cellules de *Allium cepa* observée avec différents traitements (original). j : métaphase ; k : chromosome isolé ; l : métaphase, m : prophase ; n : c-mitose; o : anaphase ; p : c-mitose ; q : télophase ; r : c-mitose.

Tableau V : Le pourcentage des aberrations chromosomiques observé dans le cycle cellulaire d'*Allium cepa* chez les groupes expérimentaux.

type d'aberration groupe	c-mitose %	Cassure %	Multipolaire %	Chromosome isolé %	Pontage %
DMSO	-	-	-	-	-
Mutagène 50	0.06±0.06	-	-	-	0.01±0.01
Mutagène 100	0.41±0.18	0.08±0.05	-	0.01±0.05	-
Mutagène 300	0.58±0.30	-	-	-	0.01±0.01
Populus 100	-	-	-	-	-
Populus 300	-	-	-	-	-
Populus 100+azide100	-	-	-	-	-
Populus 300+azide100	-	-	-	-	-
Ulmus 100	0.22±0.11	0.02±0.01	-	-	-
Ulmus 300	0.41±0.14	-	0.06±0.06	-	-
Ulmus 100+azide 100	0.20±0.12	-	-	-	-
Ulmus 300+azide100	-	-	-	-	-

1-Les valeurs sont les moyennes + SEM, test LSD ou comparaison planifié (n=7)

L'analyse des cellules des racines de *A. cepa* immergées dans le milieu contenant l'Azide de sodium a montré que la fréquence des aberrations augmente avec l'augmentation de la concentration du mutagène. Des blocages au niveau des prophases, des c-mitose, des cassures et des chromosomes isolés avec des pontages ont été observés au niveau des cellules traitées par l'azide de sodium pendant 18h. Aucune perturbation du cycle cellulaire n'a été provoquée par l'incubation des racines dans le milieu contenant l'extrait de *P. nigra*.

L'activité mutagénique de l'extrait de *U.campestris* a 100 et 300 µg/ml s'est révélée par des blocages, c-mitose, cassures, et cellules multipolaires.

L'activité mutagénique de l'azide de sodium a été complètement inhibée par l'extrait *P.nigra* à 100 et 300µg/ml. Une activité anti-mutagénique a été observée en présence de *U.campestris* à 300µg/ml, alors que des c-mitose ont été observées au niveau des cellules de racine traitées avec l'Azide de sodium à 100µg/ml et *U.campestris* à 100µg/ml.

III.2 Discussion

Les bourgeons de *Populus nigra* et l'écorce de *Ulmus campestris* ont été récoltés dans un endroit loin de tout impact de pollution afin de préserver la composition chimique des extraits préparés à partir de ces plantes et pour éviter toutes éventuelles toxicité non liée à la composition des échantillons à tester.

Des études ont rapporté que l'extraction des composés phénoliques à partir d'une partie de plante est influencée par la nature chimique de ces derniers, la taille des particules de l'échantillon, la méthode d'extraction utilisée, le temps et les conditions de stockage (Chavan et al., 2001; Goli et al., 2004).

Dans le but d'une bonne conservation des composés actifs, les bourgeons de *Populus nigra* et l'écorce de *Ulmus campestris*, ont été séchés dans des conditions de température et d'obscurité pour éviter toute détérioration des composés présents dans les extraits.

Nous avons utilisé une poudre très fine de diamètre inférieure à 63µm afin d'obtenir une meilleure extraction (Shih et al., 2009). L'éthanol utilisé dans cette méthode d'extraction est le solvant qui extrait le maximum de composés phénoliques, et le moins toxique en comparant à d'autres solvants (Cowan, 1999).

Les organismes vivants sont fréquemment exposés aux agents environnementaux qui possèdent la capacité d'induire des altérations chromosomiques, un phénomène qui peut mener au développement des processus cancéreux et à la mort cellulaire (Deniz et al, 2009)

Il est généralement admis qu'un lien de causalité existe entre le potentielle gènotoxique de produits chimiques et de leur cancérogénicité (Rank, 2003).

La détection de ces produits et leurs effets probables sur les organismes vivants sont importants pour l'étude de leur impact sur les animaux, les végétaux et l'Homme. Plusieurs composés d'extraits de plantes ont montré des activités mutagéniques et anti mutagéniques (Akinboro et al., 2007; S'anchez et al., 2008 ; Silva et al., 2008; Brindzová et al., 2010; Wan-Ibrahim et al., 2010; Liua et al., 2011; Carla et al., 2012).

Les agents mutagéniques peuvent être cytologiquement détectés par l'inhibition du cycle cellulaire d'autres organismes, par interruption de la métaphase, induction des aberrations chromosomiques numériques et structurales, des échanges entre les chromatides sœurs et d'autres (Vieira et Vicentini, 1997).

Dans cette étude et dans le but d'évaluer l'activité génotoxique et antigénotoxique des extraits de deux plantes médicinales (bourgeons de *Populus nigra* et écorce de *Ulmus campestris*), nous avons utilisé le test de *Allium cepa*.

Le test *Allium cepa* comme méthode d'évaluation de la génotoxicité présente plusieurs avantages, les cellules des racines de l'*Allium* possèdent un système d'oxydation capable d'activer un promutagène ou des produits chimiques génotoxiques (Rank, 2003).

Allium cepa a été sélectionné comme modèle d'étude de l'activité génotoxique et antigénotoxique à travers une étude macroscopique où l'aspect et la croissance des racines ont été observés et une étude microscopique qui permet de déterminer l'indice mitotique et de déceler les différentes aberrations et perturbations du cycle cellulaire après analyse des cellules des racines cultivées en présence de la substance à tester (Solange et al., 2012). Par ailleurs, l'espèce, *A. cepa* possède de grands chromosomes et en nombre réduit ($2n = 16$) (Kwan et al., 2012), ce test est de grande sensibilité. Il offre des informations importantes pour évaluer les mécanismes d'action d'un agent mutagène et ses effets sur le génome d'un organisme (Rank, et al., 1993; Rank, 2003; Bakare, 2004; Akinboro et Bakare, 2007; Daniela et al., 2009; Saxena et al., 2010; Mamta et al., 2011; Haywood et al., 2012; Kwan et al., 2012). La méthode de détermination des aberrations chromosomiques au niveau des racines de *Allium cepa* est validée par le IPCS (International Programme on Chemical Safety) et UNEP (the United Nations Environmental Programme, comme test efficace pour l'étude *in situ* de la génotoxicité des substances (Gracieli, et al., 2010)

Dans le test *Allium cepa*, l'inhibition de la croissance des racines et l'apparition des racines fragiles en présence de l'agent mutagène, indique une cytotoxicité, alors que le flétrissement explique une toxicité.

Dans notre étude il a été trouvé une réduction du taux de croissance et la fragilité des racines des bulbes incubées en présence de différentes concentrations de l'agent mutagène.

Plusieurs études ont rapporté la cytotoxicité de l'azide de sodium dans plusieurs systèmes d'études, les bactéries, les plantes supérieures et cellules humaines, cet agent agit en inhibant

les protéines de la réplication de l'ADN (Sandhu et al., 1994; Rang et Nielsen, 1997; Ahmes et al., 2007; Alka et al., 2012; Ambreen et al., 2012; Sheikh et al., 2012).

La toxicité induite par l'azide de sodium est liée à sa dissolution dans l'eau qui forme un gaz d'azide d'hydrogène toxique, avec génération d'ions azide qui sont génotoxiques et cytotoxiques (Sheikh S. et al., 2012). Une autre étude a indiqué que la mutagenèse induite par l'azide était due à l'accumulation de peroxyde (Ragunathan et Pannercsel, 2007).

La non toxicité chez les mammifères est liée à la présence d'une enzyme responsable de la conversion de l'azide en azidolamine nom toxique n'ayant aucune interaction avec l'ADN. (Ragunathan et Pannercsel, 2007).

L'extrait de *Populus nigra* n'a montré aucune activité anti-proliférative, alors qu'*Ulmus campestris* s'est révélé cytotoxique à 300µg/ml.

Il existe une relation linéaire entre l'aspect macroscopique (longueur des racines) et l'aspect microscopique (nombre de cellules en division) (Fiskesjö, 1997; Bakare et al., 2004; Babatunde et al., 2006).

Néanmoins le retard de croissance et le flétrissement des racines sont accompagnés d'une suppression de l'activité mitotique et la présence des aberrations chromosomiques.

Selon Konuk et ses collaborateurs (2007), la réduction de l'indice mitotique montre que le matériel expérimental à un effet mutagénique entraînant l'inhibition de la mitose. Les résultats ont montré que l'azide de sodium a un effet antimitotiques, il perturbe le cycle cellulaire normale en empêchant biosynthèse de l'ADN (Sadia and Vahidy, 1994).

Un agent mutagène peut réduire l'indice mitotique selon plusieurs mécanismes, par un blocage de l'ADN en phase G1, G2 ou par inhibition de la synthèse d'ADN en phase S (Sudhakar et al., 2001). Dans notre étude, les anomalies induites par l'azide de sodium sont divers; c-mitose, des cassures, pontage, cellules multipolaire, chromosome isolé. La C-mitose, est l'anomalie la plus fréquemment observée, qui se produit suite à une perturbation des microtubules par l'azide ce qui entraîne c-mitose aneuploïdie. L'azide de sodium peut se lié à un chromosome et bloque son mouvement ce qui le laisse isolé du reste du patrimoine (Konuk et al., 2007).

Les ponts ont été observés en anaphase principalement, cela pourrait se produire au cours de la translocation et l'échange de chromatides ou en raison de la présence de chromosomes

dicentriques. Ces ponts provoquent des aberrations chromosomiques structurales (Haliem et *al.*, 1990) alors que les cassures chromosomiques résulte d'une perturbation du fuseau mitotique (Paramjit et *al.*, 2009).

Il n' y a pas de données dans la littérature, au moins à notre connaissance, sur la génotoxicité et l'antigénotoxicité de ces deux plantes populaires très utilisées en médecine traditionnelle.

L'étude de la génotoxicité et la mutagénèse des plantes est importante avant toute application pharmaceutique (Macedo et *al.*, 2008; Ferreira et *al.*, 2009).

L'extrait de *Populus nigra* a montré une activité antimutagénique très significative par contre l'extrait de *Ulmus campestris* a montré une activité antimutagénique significative, et une activité cytotoxique à forte concentration.

L'activité des deux plantes peut être due à leur composition en métabolites secondaires. En effet *P. nigra* contient des phénols glycoside tels que, salicine et populine (Toiu et *al.*, 2011) qui possèdent un potentiel anticancéreux par l'inactivation de pro-carcinogènes, ou en stimulant la réparation des ADNs mutés (Scalbert et *al.*, 2003). D'autre étude ont signalé que les glucosides pourraient être considérés comme des composés essentiels pour le développement d'agents protecteur du matériel génétique (Abbassy et *al.*, 2007).

Les acides phénoliques tels que, l'acide caféique, acide p-coumarique, la quercétine et lutéolin ont été identifiés dans les bourgeons de *P.nigra* (Goetz, 2011). Des études ont suggéré l'effet antimutagénique des acides phénoliques (Brindzová et *al.*, 2010). Birosová et Mikulášová (2005) ont montré que l'effet mutagénique de l'azide de sodium a été inhibé par les acides phénoliques qui ont augmenté de 20-35% l'indice mitotique.

L'inhibition de la mutagenèse est souvent complexe, qui s'opère par l'intermédiaire de multiples mécanismes (Edenharder et Grünhage, 2003). Des études ont rapporté une interaction directe entre les composés phénoliques présents dans l'extrait et l'agent mutagène, ces composés peuvent également affecter le métabolisme d'activation de ce dernier (Nakai et *al.*, 2008).

Le rôle protecteur exhibé par l'extrait de *Populus nigra* contre une génotoxicité induite par l'azide de sodium peut être en partie due a son activité antioxydant. en particulier l'activité anti radicalaire.

Il a été aussi rapporté que l'extrait de bourgeons de *P.nigra* pourrait induire l'expression des gènes des enzymes antioxydants (Dudonné et al, 2011).

Cette étude révèle que 100µg/ml d'extrait brut de *Populus nigra* a un potentiel antimutagenique efficace contre les aberrations chromosomiques induites par NaN₃ (100µg/ml) les composés présents dans cet extrait peuvent agir par la réduction des ERO et dégradation des peroxyde accumulés et desions d'azide. L'inhibition des aberrations chromosomiques par l'extrait de *P.nigra* suggère une activité antimutagenique et anticarcinogénique de ce dernier qui peut protéger l'ADN contre les lésions provoqués par différents agents, les radiations, produits chimiques et autres.

Plusieurs espèces de *Ulmus* ont été étudiées, il a été montré que les extraits de *Ulmus davidiana* et *Ulmus macrocarpa* contiennent des flavonoïdes comme la catéchine et ses dérivés (Jung et al., 2010). Il a été rapporté que ces composés peuvent augmenter la résistance des lymphocytes contre des lésions de l'ADN induites par des mutagènes alimentaires (Wu et al., 2004).

L'écorce de *Ulmus campestris* est riche en tanins et en flavonoïdes, les tanins provoquent la précipitation et l'inhibition enzymatique des protéines du cycle cellulaire, qui pourrait être responsable de l'inhibition de la division cellulaire dans les cellules méristématiques de *A. cepa* (Teixeira et al., 2003). Il a été suggéré que la toxicité de certaines espèces est liée à la présence de certaines classes de flavonoïdes qui à certaines concentrations sont cytotoxiques (Ya-Qin et al., 2001). En outre, selon Bu-Abbas et ses collaborateurs, (1996), certains composés sont cytotoxiques à de fortes concentrations, alors qu'ils ont exhibé des activités anti-mutagénique très significatives à de faibles concentrations. Aussi, Edenharder et Grünhage (2003) ont rapporté que l'activité antimutagénique de divers composés d'origine végétale peut être dépendante ou indépendante de la concentration.

Conclusion et perspectives :

La réponse du matériel génétique des cellules méristématiques des racines d' *Allium cepa* à la présence de substances avec un potentiel cytotoxique, génotoxique ou anti-génotoxique dans les extraits de bourgeons de *P.nigra* et d'écorce d' *U.campestris* a été déterminée.

En se basant sur nos résultats, nous pouvons conclure que l'extrait de bourgeons de *P.nigra* possède un potentiel anti-mutagénique dose-dépendant contre les dommages induits par l'azide de sodium. Aucune cytotoxicité n'a été révélée aux concentrations testées.

L'extrait de *U. campestris* a montré un effet anti-prolifératif suggérant un potentiel thérapeutique possible pour cette espèce dans l'inhibition du cycle cellulaire chez les organismes eucaryotes.

Cependant le mécanisme d'action des composés actifs reste à élucider et d'autres recherches sont nécessaires pour clarifier ces points.

Des études complémentaires auront pour but de:

- Purifier les composés actifs responsables des activités testées
- Déterminer la DL₅₀ des composés actifs sur le modèle *A. cepa*
- Réaliser des tests de génotoxicité sur un modèle animal
- Elucider le mécanisme d'action des composés actifs.

References bibliographiques

- Abbassy, M., Samir, A.M., Abdelgaleil, A.H. Belal, M.A., Abdel Rasoul, A., (2007). Insecticidal, antifeedant and antifungal activities of two glucosides isolated from the seeds of *Simmondsia chinensis*. *Industrial Crops and Products*, 26, 345–350.
- Ahmes, T.B., Shahma, M., Madi, A., (2007). Comparative analysis aberration induced by diethyl sulphate (DES) and Sodium Azide (SA) In *Vicia Faba*. L. (Fabaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (5), 783-787.
- Akinboro, A.B., Bakare, A.A., (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* . *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470–475
- Alka, M.Y.K., Ansari, T.M.B., Choudhary, S., Rumana, A., (2012). Genotoxic effect of Ethylmethane Sulphonate and Sodium Azide in *Linum Usitatissimum* L. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 9 (3), 1-9.
- Ambreen, A.M, Ansari, A., Hisamuddin, F., (2012). Cytological effect of Ethyl Methane Sulphonate and Sodium Azide in *Linum Usitatissimum* L. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 2 (1), 70-75.
- Angel, S., Gladys F., Jorge, L.F., Renata, C., Enrico, C., Mario, F., Ruggero, R., Paolo, P., Francesca, D., Rosella, D., (2008). Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 416–422
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D., (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303–309.
- Augustin, S., Barry, H., James, A., Joseph, B., (2003). Les polyphénols des fruits et légumes : un atout pour vieillir en bonne santé. Laboratoire des Maladies Métaboliques et Micronutriments INRA Saint-Genes-Champanelle – France. 5-7.(poly important)
- Babatunde, B.B., Bakare, A.A., (2006). Dépistage de la génotoxicité des eaux usées à partir de Agbara Industrial Estate Nigeria évaluée selon le test *Allium*. *Pollution Research*, 25, 227-234.

- Bagatini, P.B., Roberta, P.P., Manoela, T.R., Cynthia, H.C., Sharbel, W.M., (2008) Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *Mutation Research*, 657, 111–115.
- Bakare, A.A., Wale-Adeyemo, A.R., (2004). Le potentiel mutagène et cytotoxique effet des lixiviats de domesticwastes et Aba-Eku décharge Nigeria sur *Allium cepa*. *Journal de la nature de la technologie de la pollution de l'environnement*, 3, 455-462.
- Beloued, A. 2001. *Plantes médicinales d'algérie*. Office puplication universitaire, 150-162.
- Beloued, A. 2008. *Plantes médicinales d'algérie*. Office puplication universitaire, 173-180.
- Benkiki, N., (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *rutamontana*, *matricariapubexens* et *hypericum*. Thèse de doctorat de l'Université de Batna. 117-124.
- Bernard, W., (2011). Ressources végétales riches en polyphénols. *Pharmacognosie et Molécules Naturelles Bioactives*, Faculté de Pharmacie - Université de Strasbourg.22-27
- Bhat, R., Hadi, S.M., (1994). DNA breakage by tannic acid and Cu (II): sequence specificity of the reaction and involvement of active oxygen species. *Mutation Research*, 313(1), 39–48.
- Birosová, L., Mikulášová, M., Vaverková, S., (2005). Antimutagenic effect of phenolic acids. *Food and Chemical Technology*, 149(2), 489-491.
- Birt D. F., Hendrich S., and Wang W. (2001), Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.*90, 157-177.
- Bos, M.A., Vennat, B., Meunier, M.T., Pouget, M.P., Pourrat, A., Fialip, J., (1996). Antioxydant proprieties towards lipoperoxidation and anti-elatase activity. *Biology and Pharmacology Bulletin*, 19, 146-148.
- Breu, W., (1996). *Allium cepa L.* (Onion) Part 1: Chemistry and analysis. *Phytomedicine*, 3(3), 293-306.
- Brindzova, L., Mikulašova, M., Takacsova, M., Mošovska, S., Opattova, A., (2009). Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of extracts from oat, buckwheat and wheat bran in the *Salmonella* microsome assay. *Journal of Food Composition*, 22, 87–90.
- Bruneton, J., (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris, Lavoisier Tec & Doc, 253-270.

- Bu-Abbas, A., Nunez, X., Clifford, M., Walker, R., Ioannides, C., (1996). A comparison of the antimutagenic potential of green, black and decaffeinated teas: contribution of flavanols to the antimutagenic effect. *Mutagenesis*, 11, 597-603.
- Carla, C.M., Pollyanna, F.O., Ildercílio, M.S., Lima, P.S., Martins, L., Carvalho, J., Jairo, C., Denise, C., (2012). Évaluation du potentiel cytotoxique et génotoxique et antigénotoxique de *Solanum lycocarpum* fruits glicoalkaloïde extraire dans les cellules. *Food Chemistry*, 79, 43-44
- Chang, Y.C., Chien, C.T., Teng, K.Y., Chou, S.T., (2005). Antioxidative and mutagenic properties of Zanthoxylum anthoides. *Food chemistry*, 418-425.
- Chavan, U.D., Shahidi, F., Naczk, M., (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L*) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75, 509-512.
- Chiang, H.C., Lo, Y., Lu, F. J., (1994). Xanthine oxydase inhibitor from the leaves of *Alsophia sp inulosa*. *Journal of enzyme inhibition*, 8, 61-71.
- Colic, M., Pavelic K., (2000). Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *Journal of Molecular Medicine*, 78 (6):333 – 336.
- Cowan, M. M., (1999). Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 9, 564-582.
- Daniela, M.L, Aparecida, M.M., (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, 71–81.
- Dar, M.S., Ikram, M., Fakouhi, T., (1976). Pharmacology of *Quercus infectoria*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(12), 1791–1794.
- Deniz, Y., UNAL, F0, Cengiz, S., (2009) Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa L*. *Turk Journal Biological*, 33, 283-290.
- Edenharder, R., Grünhage, D., (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*, 540, 1–18.
- Ennis, D.G., (2001). Mutagenesis. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2-5.

- Erin, E., Mulvihill, B., Murray, W., Huff, P., (2010). Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can Journal Cardiol*, 261, 7-21.
- Etine, J., Clauser, E., (2001). Biochimie génétique, biologie moléculaire. 7eme édition, masson. 271-272.
- Fekadu, K., Wolfram, P., Stephen, M., Johnson, I., Giinther, L.C., Sontag, G., Siegfried, K., (1996). Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chemico-Biological Interactions*, 102-116.
- Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M., Monarca, S. (2007): *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addition and Contamination*, 24(6), 561-572.
- Ferreira, F.G., Regasini, L.O., Oliveira, A.M., Campos, J.A., Silva, D.H., Cavalheiro, A.J., Santos, R.A., Bassi, C.L., Bolzani, V.S., Soares, C.P., (2009). Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. *Revista Bras Farmacogn*, 19, 61-67.
- Fiskesjö G, (1985). *The Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99–112.
- Fiskesjö, G., (1997). *Allium* essai pour les produits chimiques de dépistage, l'évaluation des cytologiques paramètres. Dans: Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Dir.), *Plantes à Études environnementales*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, New York, 9, 308-333.
- Fractianni, F., Di, L., Coppola, R., Nazzaro, F., (2006). Mutagénic end antimutagénic properties of aqueous and ethanolic extract from. Fresh and irradiated tuber *aestivum* black truffle; preliminary study. *Food chemistry*, 471-474.
- Giri, A.K., Mukhopadhyay, A., Sun, J., Hsie, A.W., Ray, S., (1999). Antimutagénic effet of centchroman contraceptive end a candidate drug for breast cancer in multiple mutational assays. *Mutagenesis*, 613-619.
- Goetz, P., (2011a). phytothérapie de l'inflammation (partie I). *phytothérapie*, 9, 310-317
- Goetz, P., (2011b). phytothérapie de l'inflammation (partie II). *phytothérapie*, 9, 362-368.

- Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A., (2004). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*pistachiavera*) hull extract. *Food chemistry*, 92, 521-525.
- Gorinstein, S., Vargas, M., Nicolas, O., Jaramillo, I.A.S., Martinez, A.L., Arancibia, P.A., Toledo, F., Katrich, E., Trakhtenberg, S., (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur Food Research and Technology*, 225, 321–328.
- Gracieli, D.N., Tamara, P., Haywood, D.L., Thais, S.D., Solange, B.T., (2010) Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocellular*, 34(3), 95-101.
- Gundermann, K., Müller, J., (2007). Phytodolor effects and efficacy of a herbal medicine. *Wien Medicine Wochenschr*, 157(13), 343-347.
- Haliem, A.S., (1990). Cytological effects of the herbicide sencor on mitosis of *Allium cepa*. *Egypt Journal Botanic*, 33, 93-104.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8, 89-193.
- Haywood, D.L., Daniel, P.M., Estela, S.A., Rieger, V.D.F., Marli, F.F., Solange, B.T., (2012). Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, 432, 180–188.
- Hopkins, W.G., (2003). physiologie végétale. De Boeck. 514.
- Horn, R., Vargas, V.M.F., (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. *Toxicology. In Vitro*, 22, 1143–1149.
- Hurabielle.M., (1981). Abrège de matière médicale (pharmacognosie) tom 1 eddition masson. 250-260.
- Iris, C.Z., Milena, V., Massimo, M., Luca, D., Mar, B., Isla, A., (2008). Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* . *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 330–335.

- Kaur, S.J., Grover, I.S., Kumar S., (2000). Modulatory effects of tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Food and chemical toxicology*, 38(12), 1113-1119.
- Kirsch-Volders , M., Elhajouji, A., Cundari, E., Hummelen, P., (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosomal breakage, chromosome loss and non disjunction. *Mutation Research*, 392, 19-30.
- Knezevic, J.V., Vucovic, G.B., Stevia, T., Stanajevic, J., Nicolic, B., Simie, D., (2005). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*salvia officinalis* L) and its fractions against UV. Induced mutations in bacterial and yeast cells. *Arch biology*, 57(3), 163-172.
- Kwan, Y.P., Darah, I., Umikalsom, Y., Chen, Y., Sreenivasan, S., (2012) Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules*, 17, 7782-7791.
- Lah, B., Zinko, B., Tisler, T., Marinsekand, L.R., (2005). genotoxicity detection in drinking water by Ames test, zimmermann test and comet assay. *Acta chim. Slov*, 341-348.
- Liua, W.C., Giorgioa, M., LamidibElias, R., Ollivier, E., (2011). Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 176–183.
- Macêdo, M., Sisenando, H., Queiroz, J., Argolo, A., Saturnino, A., Coelho, L., Batistuzzo-de- Medeiros, S., (2008). Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. *Review Bras Farmacogenetic*, 18, 509-516.
- Mamta, K.S., Sudheer, K., Sunandan, P., Amitava, M., Natarajan, C., (2011). Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 613–621.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. *American Journal Clinical and Nutriment*, 81, 23-42.
- Marfak,A., (2003). Radiolyse gamma des flavonoides et études de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat de l'Université de l'Limoges, 23-42.

- Maron, D., Ames B., (1983). Methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Revised Mutation Research*, 113, 173-215.
- Massimo, D., Carmela, F., Roberta, D.B., Raffaella, G., Claudio, G., Roberta M., (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Journal of science*, 43(4), 348-361.
- Matés, J. M.; Gomez-Pérez, C. and Nunez DE Castro, I. (1999). Antioxydant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8):595-603.
- Mckelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., Méo, M.P., Collins, A., (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay). A European review, *Mutation Research*, 288, 47-63.
- Michael, F., (2000). The in vitro micronucleus technique Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. *Mutation Research*, 81–95.
- Michel, E., (2011). Essences et huiles essentielles : précaution d'emplois et conseils d'utilisations. *Centre de formation en armothérapie*, 1-3.
- Mošovska, S., Mikulašova, M., Brindzova, L., Valik, L., Mikušova, L., (2010). Genotoxic and antimutagenic activities of extracts from pseudocereals in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1483–1487.
- Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y *et al* (2002). Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer*; 98: 761–9.
- Muhsin, K., Recep, L., Hakki, C., (2007). Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pakistan Journal of Botanic*, 39(1), 73-79.
- Nakai, V.K., Oliveira R.L., Gonçalez, E., Fonseca, H., Ortega, E.M.M., Corrêa, B., (2008). Distribution of fungi and aflatoxin in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106, 285–290.
- Paramjit, G., Singh, P.V., Prabhakar, U., Reddy A., Balasubramanyam A., Mahboob, M.F., Rahman, S.M., (2009). In vivo assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1964–1971.
- Pedrazzani, R., Ceretti, E., Zerbini, I., Casale, R., Bertanza, E.G.G, Gelatti, U., Donato, F., Feretti, D., (2012). Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 274–281.

- Ragunathan, I., Panneerselvam, N., (2007). Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(7), 470-475.
- Rank, J., (2003). The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Ekologija*, 22, 38–42.
- Rank, J., (2003). The method of allium anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologika*, (7), 38-42.
- Rank, J., Nielsen, M.H. (1997): *Allium* anaphase-telophase genotoxicity assay. Department of Environment, Technology and Social Studies, Roskilde University, Denmark
- Rank, J., Nielsen, M.H., (1993). A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, 18, 49–53.
- Ribera, G., (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition. Dunot.Paris.. P 173-201.
- Rong, T., (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Sadia, K.B., Vahidy, A.A., (1994). Cytotoxic effect of herbicide ronstar on meristamic cells of *Allium cepa*. *Pakistan Journal of Botanic*, 26, 69-74.
- Saxena, P.N., Gupta, S.K., Murthy, R.C., (2010). Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: A spectroscopic approach for chromosome damage. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96, 93–100.
- Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., Nacro, M., (2010). Anatomy and tannins concentration in tannins producing species of burkina faso. *Journal of science*, 10(2), 24 – 32.
- Sheikh, S.A., Wani, M.R., Lone, M.A., Tak, M.A., Malla, N.A., (2012). Sodium Azide induced biological damage and variability for quantitative traits and protein content in wheat (*Triticum Aestivum* L). *Journal of Plant Genomics*, 2 (1), 34-38.
- Shuzhong, Z., Xinning, Y., Robert, A., Coburn b., Marilyn, E., Morris, a., (2005). Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochemical Pharmacology*, 70, 627–639.

- Silué, S., Fondio, L., Coulibaly, M.Y., Magein, H., (2003)., Onion- Varietal adaptation- Ivory Coast. Sélection de variétés d'oignon (*Allium cepa* L.) adaptées au nord de la Côte d'Ivoire. *Tropicultura*, 21(3), 129-134.
- Silva, C.R., Monteiro, M.R., Rocha, H.M., Ribeiro, A.F., Caldeira, A., (2008). Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 22, 212–218.
- Simon, B., 2007 Lésion et correction de l'ADN. In : biologie moléculaire. Ediscience. Paris : Dunod., 113-117.
- Solange, B.T., Haywood, D.L., (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*, (8), 138-154.
- Stephane, M., (2008). Produits chimiques cancérigènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction : substances mutagènes [en ligne]. Institut nationale de recherche et de sécurité. Paris : Béatrice-Anne Fournier, 68-80. [http:// www.inrs.fr](http://www.inrs.fr).
- Sudhakar, R., Ninge Gowda, K.N., Venu, G., (2001). Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cell of *Allium cepa*. *Cytologia*, 66, 235-239.
- Teixeira, R.O., Camparoto, M.L., Mantovani, M.S., Vicentini, V.E., (2003). Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. And *Achillea millefolium* L. in vivo assays. *Genetic Molecular Biology*, 26, 551-555.
- Vargas, V.M.F., Migliavacca, S.B., de Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Ferreira, I.C.F.S., Pestana, M.H.D., (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490, 141–158.
- Verschaeve, L., Gilles, J., (1995). The single cell gel electrophoresis assay in the earth worm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bulletin of Environment and Toxicology*, 112-119.
- Vogel, W.E., Nivard, M.J.M., (1993). Performance of 181 chemicals in drosophilla assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis*, 57-81.

- Wu, L.T., Chu, C.C., Chung, J.G., Chen, C.H., Hse, L.S., Liu, J.K., (2004). Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxideinduced DNA strands break in human lymphocytes. *Mutation Research*, 556(1–2), 75–82.
- Ya-Qin, S., Toshio, F., Hiroshi, S., Wen-Jin, C., Pei-Quan, Y., Feng- Peng, W., Taro, N., (2001). Cytotoxic favonoids with iso-prenoids groups from *Morus mongolica*. *Journal of National Production*, 64, 181-188.

Abstrat

The effects of different concentrations of *Populus nigra* buds and *Ulmus campestris* bark extracts on root growth, cell division, chromosome morphology in root tip cells of *Allium cepa* were studied. Also, in the same system the anti-genotoxic effects induced by sodium azide of extract were also evaluated. It was observed that sodium azide reduces root growth and causes mitotic irregularities, including c-mitosis, anaphase bridges, and chromosome stickiness. The total number of aberrations induced by sodium azide (100 µg/ml) was significantly ($p < 0.001$) reduced in *Allium cepa* root meristem cells pretreated with *P.nigra* extract in dose dependant manner. The study reveals that *P.nigra* has antimutagenic potential against sodium azide induced chromosomal aberrations. In addition *U. campestris* decreased mitotic index depending on the tested concentration and presented antiproliferative effect at a highest concentration, but the mechanism of action of tested extracts remains unknown.

Key word: *Populus nigra* buds, *Ulmus campestris*, *Allium cepa* test, Sodium azide, Genotoxicity,

Résumé

Les effets de différentes concentrations d'extraits de bourgeons de *Populus nigra* et de l'écorce de *Ulmus campestris* sur la croissance des racines, les divisions cellulaires et la morphologie dans les cellules des extrémités des racines de *Allium cepa* ont été étudiés. Aussi dans le même système l'activité inhibitrice des extraits d'une génotoxicité induite par l'azide de sodium a été évaluée. Il a été observé que l'azide de sodium a réduit la croissance des racines et cause des irrégularités mitotiques, on cite : c-mitose, les ponts, les chromosomes en amas. Le nombre total d'aberrations induites par l'azide de sodium (100µg/ml) était significativement ($p < 0.001$) réduite dans les cellules méristématiques des racines de *Allium cepa* prétraitées avec l'extrait de *Populus nigra* de façon dépendante de concentration. Cette étude révèle que *P.nigra* a un potentiel antimutagenique contre les aberrations chromosomiques induites par l'azide de sodium. De plus *Ulmus campestris* diminue l'indice mitotique de façon dépendante de la concentration et présente un effet antiprolifératif a des concentrations élevés, mais le mécanisme d'action des extraits testés reste inconnu.

Mots clés : bourgeons de *populus nigra* , *Ulmus compestris*, test *Allium cepa*, azide de sodium, génotoxicité.

INTRODUCTION

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

*MATÉRIELS ET
MÉTHODES*

*RÉSULTATS ET
DISCUSSION*

CONCLUSION

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES