



*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

**Université A. MIRA - Bejai Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Physico- chimique**

## **Mémoire de master**

**Filière** : Sciences Biologiques

**Option** :Génétique Appliquée

**Thème**

**Etude de la génotoxicité des extraits de  
*Pistacia lentiscus* par le test d'Ames**

**Présenter par** :Benhacine Louiza et Sahil Nassima

**Composition du jury**

Mme DEBBACHE N, Maitre de conférences B ,A-Mira,bejaia présidente

Mme Atmani D, Maitre de conférences A ,A-Mira,bejaia Promotrice

Mme Tahiri O, Maitre de conférences B ,A-Mira,bejaia Examinatrice

Introduction... .01

***Chapitre I: synthèse bibliographique***

I Définition de la génotoxicité ..... 02

    I.2 Mutagenèse de la molécule d'ADN..... .. 02

        I.2.1 Les mutations germinales..... 03

        I.2.2 Mutations génique ..... 03

        I.2.3 Les mutations chromosomiques ..... .04

    I.3 Les agents mutagènes..... .. 07

        I.3.1 Agents physiques ..... .. 07

        I.3.2 Agents chimiques..... .. 07

        I.3.3 Mutagènes biologiques..... .09

    I.4 Tests génotoxiques ..... 09

        I.4.1 Test de comète..... 09

        I.4.2 Test du micronoyau..... 09

        I.4.3 SOS chromotest ..... 10

        I.4.4 Le test d'Ames ..... 10

    I.5. Les polyphénols ..... 12

        I.5.1. Structure et classification des composés phénolique..... 13

            I.5.1.1. Les flavonoïdes C6-C3-C6..... 13

            I.5.1.2. les non flavonoïdes.....13

        I.5.2. Importances des polyphénols..... 15

        I.5.3. Mutagénicité et anti-mutagénicité des plantes médicinales et polyphénols..... 16

***Chapitre II Matériels et méthodes***

II.1 Description botanique de *Pistacia lentiscus*..... 18

II.2 Description taxonomique de *Pistacia lentiscus*..... 18

II.3 Utilisation thérapeutique traditionnelle..... 19

II.4 Extraction.....19

II.5 Test de Génotoxicité.....20

    II.5.1. Système d'activation métabolique..... 21

II.5.2. Tests de Mutagénicité/Antimutagénicité.....	21
II.5.2.1. Test de mutagénicité (Test d'Ames).....	22
II .5.2.2. Test d' anti mutagénicité.....	24

***Chapitre III Résultats et discussion***

III.1 Contrôle de génotype.....	26
III.1.1. Présence du plasmide pKM 101 et mutation <i>rfa</i> .....	26
III.1.2 .Sensibilité au UV.....	27
III.3. Test de mutagénicité.....	28
III.4 Résultats du test d'anti-mutagénicité.....	33
III -5-Discussion générale.....	37
conclusion et perspective.....	40
Reference bibliographique.....	41

## LISTE DE FIGURES

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 01</b>	les différentes mutations de l'ADN	2
<b>Figure 02</b>	différents types de mutation	4
<b>Figure 03</b>	Insertion chromosomique	5
<b>Figure 04</b>	Délétion chromosomique	5
<b>Figure 05</b>	Inversion chromosomique	6
<b>Figure 06</b>	Représentation schématique d'une translocation réciproque	6
<b>Figure 07</b>	structure du methyl méthane sulfonate (MMS)	8
<b>Figure 08</b>	Modification et mésappariement induits par le MMS	8
<b>Figure 09</b>	Principe de test d'Ames	12
<b>Figure 10</b>	Squelette de base des flavonoïdes	13
<b>Figure 11</b>	photographies de fruits (A), feuilles (B) et fleurs (C) de <i>Pistacia lentiscus</i>	18
<b>Figure 12</b>	la croissance d'E.coli dans un milieu minimal ne contenant pas le tryptophane	26
<b>Figure 13</b>	L'inhibition de la croissance bactérienne dans les zones qui entourent les disques qui contiennent l'ampicilline et le Cristal violet	27
<b>Figure 14</b>	Croissance de colonies dans la moitié couverte et non couverte de la boîte de Pétri contenant une culture bactérienne de <i>E. coli</i> WP2 pkM101	28

Tableaux	Titres	page
<b>Tableau I:</b>	Classification taxonomique de <i>Pistacia lentiscus</i>	18
<b>Tableau II:</b>	Génotype de la souche <i>E. coli</i> Wp2/Pkm101	20
<b>Tableau III:</b>	Méthodologie du test mutagénique	23
<b>Tableau IV</b>	Méthodologie du test antimutagénique	24
<b>Tableau V:</b>	Effets mutagènes des extraits éthanoliques de <i>Pistacia lentiscus</i> (feuilles et graines) sans activation métabolique (- S9 )	30
<b>Tableau VI:</b>	Effets mutagènes des extraits éthanoliques de <i>Pistacia lentiscus</i> (feuilles et graines) avec activation métabolique (+S9 )	31
<b>Tableau VII:</b>	Résultats du test d'anti-mutagénicité des extraits de feuilles et graines de <i>P. lentiscus</i> sur la souche <i>E. coli</i> pKM101 sans S9 contre le MMS et le 2AF	34
<b>Tableau VIII</b>	Résultats du test d'Antimutagénicité de la souche <i>E. coli</i> WP2 (pKM101) avec l'activation métabolique S9.	36

# Remerciements

Je remercie très chaleureusement madame Atmani d'avoir accepté de m'encadrer, merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous nous avez témoigné. Malgré vos importantes obligations, vous avez toujours été- présente pour diriger nos recherches dans la bonne direction et ceci a été fondamental dans la bonne réalisation de ce mémoire. Soyez assurée de notre profonde gratitude.

Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail "et en être les examinateurs, plus particulièrement.

Madame Debbache, d'avoir accepté de présider le jury de mémoire. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

Mme Tahiri Ouahiba d'avoir accepté de juger ce travail et de participer aux jurys de cette thèse. Soyez assurée de notre profonde gratitude.

## Dédicace

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds ,je dédie ce modeste travail :

A Mes très chers parents ,sans eux je n'est paspu étre ce que je suis,en reconnaissance de leurs efforts ,leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches surtout pour m'avoir donné la confiance total.

A mes très chers frères atman,Ghilas ,Hamidouche,Fahem et Siham qui m'ont porté bonheur

A toute mes amis surtout Nourddine

A toute mes amies Sabrina

A nassima et sa famille

A tous ceux qui m'aiment .

## Dédicace

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je dédie ce modeste travail :

A Mes très chers parents, sans eux je n'est pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches surtout pour m'avoir donné la confiance total.

A mes très chers frères Salah, fares, Sahim, Salim, Rayane et Salima qui m'ont porté bonheur

louiza et sa famille

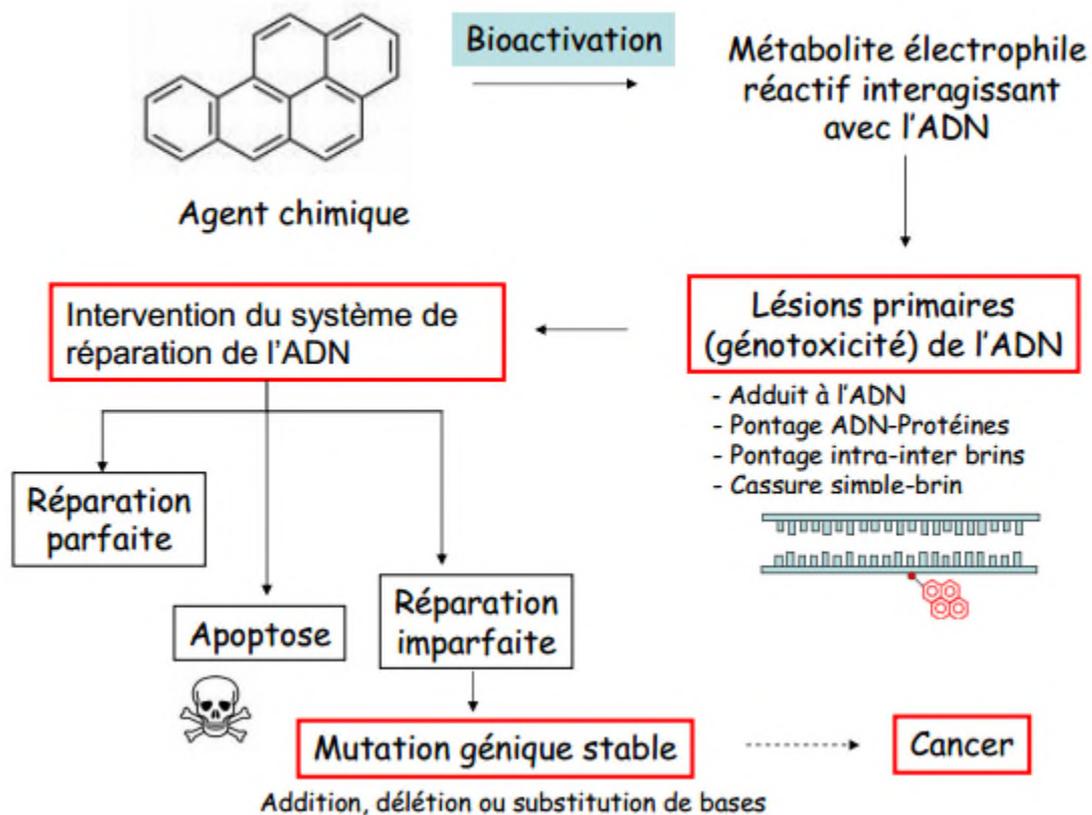
A toute mes amies khadija

louiza et sa famille

**I.1.Définition de la génotoxicité**

L'information génétique, codée chimiquement dans l'ADN, est maintenue, reproduite et transmise aux générations successives avec une grande fidélité. Des dommages à l'ADN peuvent se produire à travers le processus biologique normal ou à la suite de l'interaction de l'ADN, que ce soit directement ou indirectement, avec des produits chimiques, agents physiques ou biologiques (Young, 2002).

La toxicologie génétique ou génotoxicité est l'étude de la toxicité de substances sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), causant directement des lésions ou mutations (Figure 1). Aussi, ces mutations peuvent survenir indirectement suite à une activation métabolique par les enzymes du foie. Les systèmes de réparation de la cellule sont responsables d'éliminer ces lésions. Néanmoins, une réparation imparfaite peut aussi conduire à des mutations géniques qui risquent d'engendrer des cancers (Figure 1).



**Figure 01** : l'effet des agents chimique sur la molécule d'ADN (Fardel, 2014)

## **I.2. Mutagenèse de la molécule d'ADN**

L'ADN d'une cellule humaine moyenne subit plusieurs dizaines de milliers de lésions par cellule et par jour, dans des conditions habituelles d'activité métabolique et d'exposition aux facteurs environnementaux, physiques ou chimiques (**Quéméneur, 2007**)

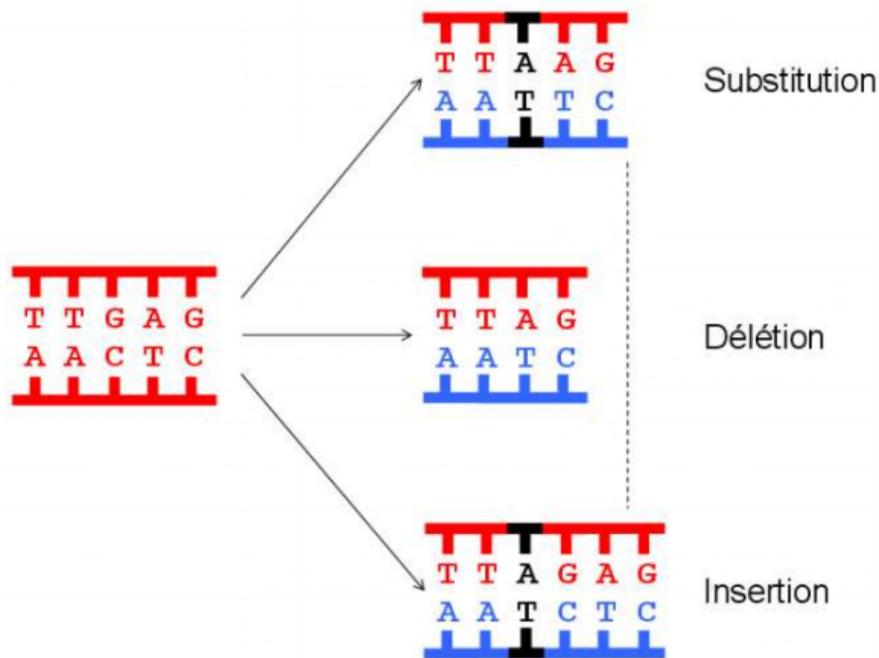
Ces lésions sont globalement néfastes causant entre autres le cancer et le vieillissement mais la mutagenèse est également un moteur de l'évolution (**Quéméneur, 2007**) et source de la diversité entre individus (**Krahn, 2010**). On distingue différents types de mutations:

### **I.2.1 Les mutations germinales**

Ce sont des changements héréditaires car elles atteignent les cellules reproductrices. Elles peuvent être perpétuées tant par la multiplication végétative que sexuée et correspondent à l'apparition d'individus nouveaux ou mutants (**Tall, 2000**).

### **I.2.2 Mutations géniques**

La mutation génique correspond à une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN de manière à soit arrêter complètement la synthèse d'une protéine, ou la modifier produisant ainsi une protéine inactive. La mutation génique la plus fréquente est la substitution, qui consiste à remplacer un nucléotide par un autre (**Krahn, 2010**). L'addition d'une base unique (insertion) ou la perte d'une base (délétion) unique font aussi partie de ce type de mutations illustrées dans la figure 2 (**Ehrenberg, 1960**) comme le 2-Aminofluoréne: qui provoque la formation d'adduits à l'ADN à la position C- 8 de la guanine (**Peter, 1982**).



**Figure 02 :** différents types de mutation génique (Hanna, 2015)

### I.2.3 Les Mutations chromosomiques

Correspondent à la perte (déletion) ou à l'addition (insertion) de fragments chromosomiques, à l'échange des fragments entre chromosomes non homologues et à la duplication ou à l'inversion d'un segment chromosomique (Tall, 2000). Ces mutations sont plus détaillées ci-dessous :

#### I.2.3.1 Insertion

L'insertion chromosomique signifie qu'un morceau de matériel d'un chromosome a été inséré dans une position anormale dans le même chromosome d'où il provient, ou dans un autre chromosome (Figure 3) (Krahn, 2010).

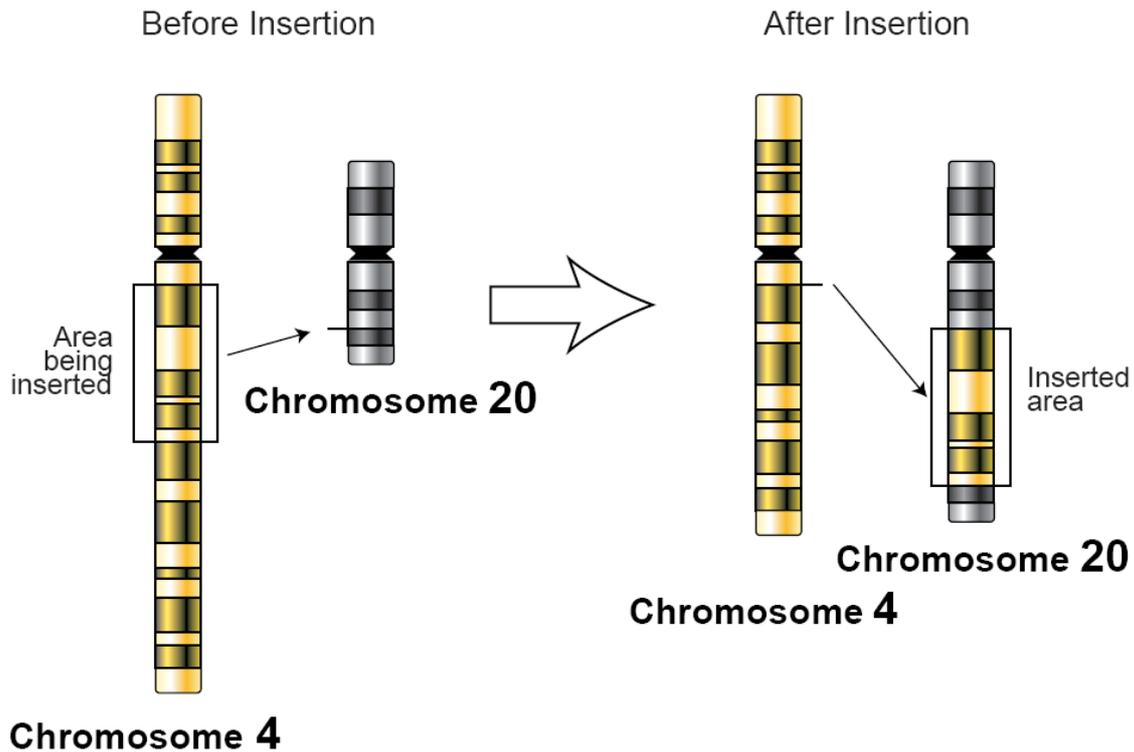


Figure 3: Insertion chromosomique (Iengar, 2012).

**I-2-3-2 Délétion**

Une délétion signifie qu’une partie d’un chromosome a été perdue ou détruite (Figure 4). Une délétion peut survenir sur n’importe quel chromosome et au niveau de n’importe quelle portion du chromosome (Hanna, 2005).

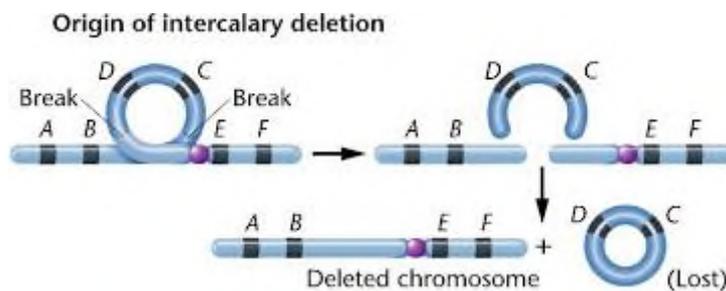


Figure 4: Délétion chromosomique (Iengar, 2012).

**I-2-3-3 Inversions et translocations réciproques**

Les inversions et les translocations réciproques sont les deux types de modifications structurelles les plus stables et les plus intéressantes.

- **Inversions** : résultent de deux cassures sur un même chromosome suivi de recollement après inversion du segment intermédiaire (Figure 5) (Lefort, 2010).

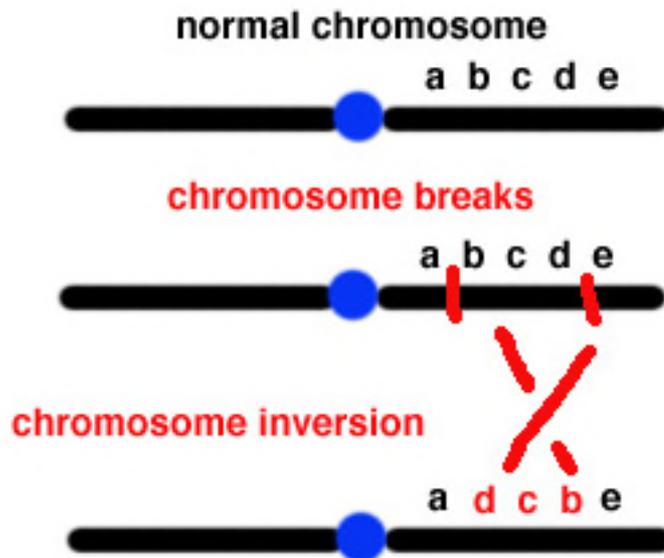


Figure 5: Inversion chromosomique (Zia, 2011).

- **Translocations réciproques** : Les translocations réciproques résultent d'échanges de matériel chromosomique entre deux chromosomes non homologues (Figure 6 ) (Cohen et al., 2001)

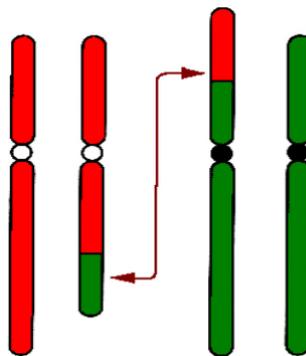


Figure 6: Représentation schématique d'une translocation réciproque (Berger, 1998).

Ces mutations peuvent être induites par différents types de mutagènes.

### **I.3 Les Agents mutagènes:**

Les agents mutagènes sont classés en plusieurs types:

#### **I.3.1 Agents physiques**

Les radiations ionisantes: rayons X, alpha, bêta, gamma produits par des substances radioactives, protons, neutrons qui induisent des mutations variables. Ces mutations peuvent être de simples mutations géniques généralement récessives mais peuvent également être des mutations de structure chromosomique généralement létales (**Tall, 2000**).

#### **I.3.2 Agents chimiques**

Ce sont des mutagènes électrophiles qui établissent une liaison covalente avec un site nucléophile d'une base d'ADN. Parmi les sites nucléophiles, les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles de bases constitutives d'ADN qui constituent les cibles privilégiées des agents chimiques génotoxiques (**Goff et al., 2006**). On en distingue:

- **Les analogues de base**

L'aminopurine, analogue de A s'apparie avec T et cause des transitions de A-T en G-C ou l'inverse (**Myron et al., 1977 ; John et al., 2001 ; Khan et al., 2012**).

Le 5bromo-uracil: induit une mutation ponctuelle via la substitution de base. Cette paire de base changera d'un AT en un GC ou de GC à AT après un certain nombre de cycles de réplication (**Roger, 1984**).

- **Les agents intercalaires**

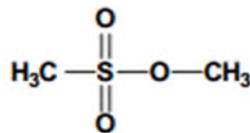
Le benzène ou l'acridine (utilisée comme colorant) sont des molécules qui s'intercalent entre les nucléotides de l'ADN au cours de la réplication. Le résultat est l'insertion ou délétion d'un nucléotide sur le brin opposé (**Langet, 2012**).

- Les modificateurs de bases

L'hydroxylamine et l'acide nitreux modifient spécifiquement la cytosine, lui permettant de s'associer avec l'adénine pour conduire à une transition d'une paire GC en AT (Perry et al., 2004)

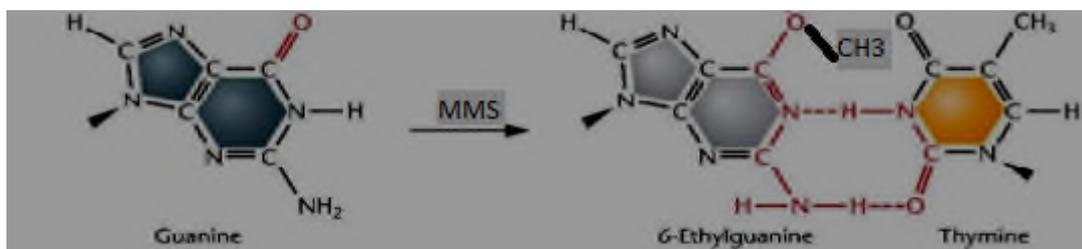
Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation alors que les adénines n'en présentent que deux sites (N3, N7). La guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN (Langet, 2012).

Un exemple d'un agent alkylant: le methyl methanesulfonate (MMS) (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (Figure 7)



**Figure 07:** structure du methyl méthane sulfonate (MMS) (Veenaeche et al., 2014).

Le MMS ajoute un groupe methyl au guanine induisant une transition de GC → AT. MMS modifie à la fois la guanine (7-méthylguanine) et l'adénine (3-méthyladenine) pour provoquer des mésappariements et le blocage de la réplication (Figure 8). Les lésions de l'ADN causées sont principalement réparées par le système « base excision repair » (BER) et la voie ADN alkyltransférases ((beranek, 1990).



**Figure 8 :** Modification et mésappariement induits par le MMS

D'autres modificateurs de base comme le 2-aminofluorène sont d'abord acétylés par les enzymes du foie (cytochrome p450) et deviennent mutagènes voire cancérigènes (Sugimura, 2000 ;Peter D et al.,1982). Cet agent cancérigène le 2-acétylamino-fluorène forme deux grands adduits d'ADN: N - (2'-Désoxyguanosine-8-yl) -2-acétylamino-fluorène (AAF-dG) et son dérivé désacétylé, le N - (2'-Désoxyguanosine-8-yl) - 2-aminofluorène (dG-AF). Ils ont

des effets extrêmement différents sur la réplication de l'ADN. dG-AAF représente un bloc solide pour la synthèse d'ADN et induit principalement des mutations du cadre de lecture dans les bactéries, ce qui entraîne la perte d'un ou deux nucléotides au cours de la réplication de la lésion. dG-AF est moins toxique et plus facilement contournée par des ADN polymérases, mais avec une fréquence accrue de misincorporation opposé à la lésion, ce qui entraîne essentiellement des transversions G → T (King, 1995 ; (Dutta et al., 2004).

### **I.3.3 Mutagènes biologiques**

On en cite : les Rétroviridae qui incluent le Virus de l'immunodéficience (SIDA), les Paramyxoviridae (virus de la rougeole) et les Filoviridae (Virus d'Ebola). Leur mutagénicité peut aboutir au développement du cancer.

### **1.4 Les tests génotoxiques :**

Les tests de génotoxicité sont appliqués depuis longtemps dans le monde pour la surveillance du risque mutagène/cancérogène chez des travailleurs exposés à des agents génotoxiques. Ils sont un outil, le seul pour l'instant, pour pouvoir évaluer les effets précoces, prédictifs du risque de cancer, de l'exposition à des agents génotoxiques (Eslava, 2004). Il est nécessaire de tester les effets mutagénique de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle. Les tests sont nombreux avec différentes spécificités.

#### **I.4.1 Test de comète**

C'est une méthode basée sur l'électrophorèse sur gel utilisée pour mesurer les dommages à l'ADN dans des cellules eucaryotes individuelles. Ce test est simple à réaliser et sensible. Bien que la plupart des expériences utilisent sa capacité à mesurer les cassures simple brin, des modifications de la méthode permettent la détection des cassures de l'ADN double-brin, réticulations, lésions de base et les noyaux apoptotiques. La limite de sensibilité est d'environ 50 cassures de brins par cellule de mammifère diploïde.

Il a été initialement développé pour mesurer la variation des dommages de l'ADN et la capacité de réparation au sein d'une population de cellules mammifères (Olive et al., 2002).

#### **I.4.2 Test du micronoyau**

Les micronoyaux sont constitués de chromosomes entiers perdus au cours de la mitose (phénomène aneugène) ou de fragments chromosomiques acentriques exclus du noyau de la

cellule fille pendant la division cellulaire (phénomène clastogène). Le test évalue l'exposition à des agents clastogènes et/ou aneugènes. C'est à la fois un test de mutations chromosomiques et de mutations géniques (**Schmidt, 1975 ; Eslava, 2004**).

Les tests du micronoyau ont émergé comme l'une des méthodes préférées pour l'évaluation des dommages de chromosome (**Fenech, 2000**).

#### **I.4.3. SOS chromotest**

Le SOS chromotest est un test *in vitro* d'altération primaire de l'ADN qui consiste en l'étude des propriétés génotoxiques d'un produit en utilisant la réponse SOS de la souche PQ37 d'*Escherichia coli*. Dans l'un des gènes SOS, le gène SfiA de l'ADN de cette bactérie a été inséré dans le gène Lac Z responsable de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase. Quand un produit génotoxique altère l'ADN et qu'il déclenche la réponse SOS, on observe une induction de LacZ et SfiA. Il y a donc une synthèse de  $\beta$ -galactosidase dont il suffit de mesurer cette activité pour déterminer le niveau d'induction du mécanisme de réparation SOS (**Lecurieux, 1994**).

#### **I.4.4. Le test d'Ames**

C'est le plus ancien des tests de toxicologie génétique (**Sari-Minodier et al., 2006**). Il utilise une bactérie *Salmonella typhimurium* auxotrophe pour l'histidine ( $his^-$ ). D'autres bactéries comme *E. coli* pKM 101 ont été conçues pour réaliser ce test. Ces dernières sont auxotrophes pour le tryptophane et résistantes à l'ampicilline à cause de la présence du plasmide Pkm 101.

Les souches de *S. typhimurium* utilisées sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation  $his^-$  rend les souches incapables de se développer sur milieu de culture dépourvu d'histidine. Avec une fréquence propre à chaque souche, cette mutation peut subir une mutation inverse spontanément vers  $his^+$ .

Le test d'Ames consiste à examiner si une substance chimique est capable d'induire des mutations chez bactéries et permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses  $his^+$  (**Figure 09**) (**Godet, 1993**).

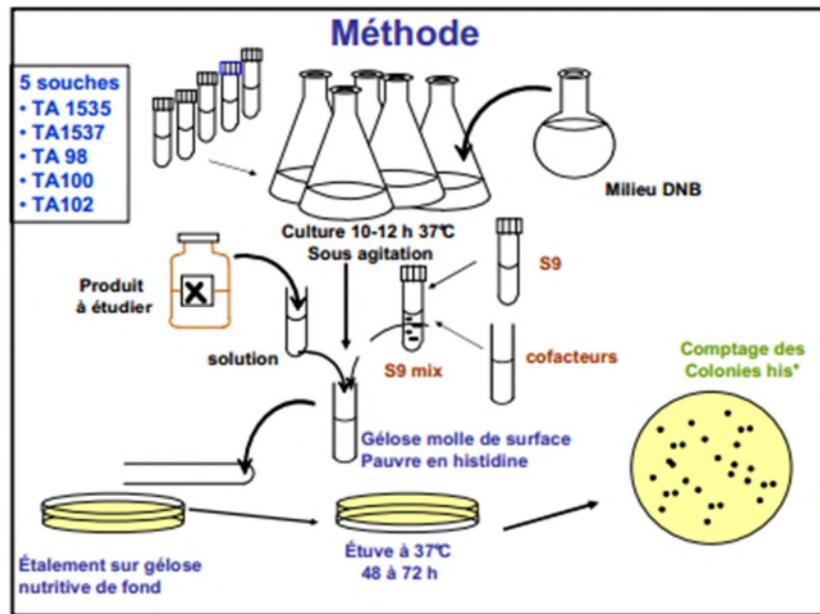


Figure 09: Principe du test d'Ames (Nesslany, 2013)

## 1.5 Les polyphénols

Les plantes possèdent des métabolites dits «secondaires» par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement d'éléments essentiels de la co-évolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques (Krief, 2003).

Les polyphénols sont synthétisés par les plantes et constituent un groupe important de substances naturelles présentes dans le règne végétal (Massaëux, 2012 ; Zarrour, 2012). Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus (Boubekri, 2014). Ils sont regroupés en différentes classes. On les retrouve en plus grandes quantités dans les fruits, les légumes et les céréales, ainsi que dans des boissons telles que le thé (Massaëux, 2012).

### I.5.1. Structure et classification des composés phénoliques

La structure des composés phénoliques peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carbone et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes: les flavonoïdes et les non-

#### I.5.1.1. Les flavonoïdes C6-C3-C6

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques reliées par un pont de 3 carbones (Chira, 2008). Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Chira, 2008; Muanda, 2010; Cabanel, 2013).

On distingue différentes structures des flavonoïdes parmi lesquels se trouvent: les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3 ols, flavyliums, chalcones, auronnes, isoflavones et isoflavonols (Muanda, 2010).

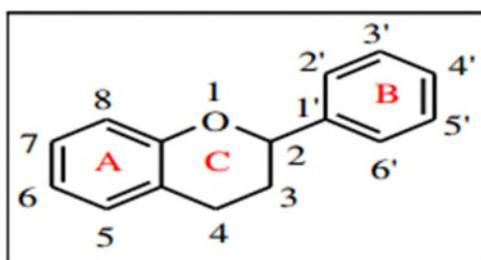


Figure 10: Squelette de base des flavonoïdes (Chira et al., 2008).

#### I.5.1.2. les non flavonoïdes

- Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Ces composés sont universellement présents chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués :

- ✓ Les acides hydroxybenzoïques, (C6-C1 ou C6-C3) dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique (Nkhili, 2009).
- ✓ Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique (Nkhili, 2009).

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide coumarique et l'acide synaptonique (Messaoudi, 2013).

- **Stilbènes C6-C2-C6**

Ce sont des phétoalexines produits suite à une attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux (Kebbab, 2014). Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthyles, estérifiés, glycosylés ou même prenylés (Boubekri, 2014).

- **Lignines (C6-C3)<sub>n</sub>**

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal. Ils résultent de la polymérisation enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 des unités adjacentes (kebbab, 2014).

- **Lignanes (C6-C3)<sub>2</sub>**

Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les retrouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et légumes. Ils n'ont guère de valeur alimentaire humaine. Ils sont présents dans la plante sous forme de glucosides (Lamblin et al., 2008 ; Bennetau-Pelissero, 2014).

- **Coumarines C6-C3**

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrène. Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides t-cinnamique et p-coumarique pour la majorité d'entre eux (Boubekri, 2014).

- **Les tannins :**

Les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (**Haslam,1994**).

On distingue deux types ;

- ✓ Tanins hydrolysables : ils sont constitués par une molécule de sucre estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés. Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique
- ✓ Tanins condensés : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols et flavan-3,4-diols .Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides ( **Nkhili, 2009**).

### **I.5.2. Importances des polyphénols**

Les polyphénols sont des métabolites secondaires que les plantes produisent pour se protéger contre d'autres organismes. Les polyphénols alimentaires jouent un rôle important dans la santé humaine. Une forte consommation de fruits, de légumes et grains entiers, qui sont riches en polyphénols, a été liée à une baisse de risques de nombreuses maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'inflammation chronique et de nombreuses maladies dégénératives (**Tsao, 2010**). Seulement, leur utilisation doit être dénuée de tout risque de toxicité ou génotoxicité.

### **I.5.3. Mutagénicité et anti-mutagénicité des plantes médicinales et polyphénols**

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**Zhang, 1998; Akinboro et al, 2007**).

#### **I.5.3.1. Mutagénicité des plantes médicinales**

Une grande attention et des efforts sont actuellement versés à la recherche et l'étude des plantes médicinales, y compris l'évaluation de leurs effets nocifs potentiels. Beaucoup d'espèces végétales qui sont aujourd'hui utilisés dans la médecine traditionnelle ont prouvé

leur efficacité au fil des années, mais souvent ces plantes, leurs extraits ou leurs préparations ne sont jamais testés pour les effets secondaires nocifs. Certaines plantes médicinales traditionnelles ont déjà été identifiées comme ayant des propriétés génotoxiques et d'autres effets néfastes sur la santé (**Atoyebi et al., 2014**). L'étude citée (**Atoyebi et al., 2014**) a découvert la cytotoxicité d'une formule composée de trois plantes *L. cylindrica*, *N. lotus* and *S. mombin*. Les auteurs ont conclu à un dysfonctionnement de chromatine ou une perturbation du cycle cellulaire dus à l'interaction des composés phytochimiques des trois plantes avec l'ADN, donc une génotoxicité de la formule.

Une autre étude (**Friedmann et al., 2010**) a utilisé le test de Comet a conclu à la génotoxicité de la sylibin à des concentrations élevées (200µM). Sylibin est une molécule extraite de la Sylimarine qui est un extrait d'une plante méditerranéenne *Silybum marianum*.

La génotoxicité aussi bien de la formule que de la sylibin explique leur action anticancérogène.

Il est donc important d'enquêter sur le plan thérapeutique, mais aussi d'étudier les effets dangereux sur la santé des plantes qui sont utilisées ou destinées à être utilisées, par exemple dans la médecine traditionnelle ou comme additifs alimentaires (**Rashid et al., 2015**).

### **I.5.3.3 Anti-mutagénicité des plantes médicinales et polyphénols**

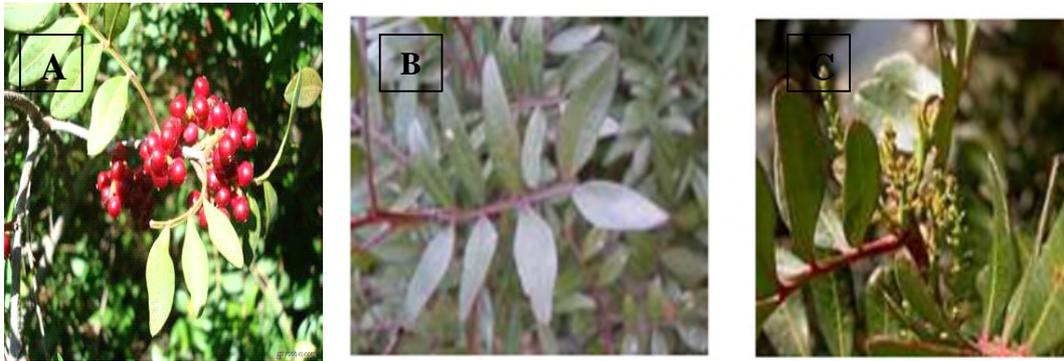
L'effet des polyphénols sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines est le plus souvent de protection ou antimutagénique et induit une diminution du nombre de tumeurs ou de leur croissance. (**Ibern-Gomez et al., 2000**). De nombreux polyphénols, tels que la quercétine, les catéchines, les isoflavones, les lignanes, les flavanones, l'acide ellagique, les polyphénols du vin rouge comme le resvératrol et la curcumine ont été testés; chacun d'entre eux ont montré des effets protecteurs dans certains modèles, bien que leurs mécanismes d'action aient été jugés différents. (**Bertelli et al., 1998**).

Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés pour l'effet de chimioprévention des polyphénols, ils comprennent une activité oestrogénique / antiestrogénique, antiprolifération, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, la prévention de l'oxydation, l'induction d'enzymes de détoxification, la régulation du système immunitaire de l'hôte, l'activité anti-inflammatoire et les changements dans la signalisation cellulaire. (**Blache et al., 1997**).

Polyphénols influencent le métabolisme des pro-cancérogènes en modulant l'expression des enzymes du cytochrome P450 impliquées dans leur activation à des agents cancérogènes. Ils peuvent également faciliter leur élimination en augmentant l'expression des enzymes de phase II de conjugaison. Cette induction des enzymes de phase II peut avoir son origine dans la toxicité des polyphénols. (**Jannin *et al.*, 2001**). Polyphénols peuvent former des quinones potentiellement toxiques dans le corps qui sont, eux-mêmes, des substrats de ces enzymes. L'apport de polyphénols pourrait alors activer ces enzymes pour leur propre détoxification et, par conséquent, induire le renforcement général de nos défenses contre les xénobiotiques toxiques. (**Chang *et al.*, 2000**).

### II.1 Description botanique de *Pistacia lentiscus*

*Pistacia lentiscus* est un arbrisseau de 1 à 3 mètres de hauteur (Boukeloua, 2009; Belkhodja, 2014), à odeur résineuse forte et à écorce lisse et grise; très répandu sur les versants rocaillieux secs, clairières et bois clairs, sur tout types de sol (Maameri, 2014) les feuilles persistantes, composées, micronucléus (Boukeloua, 2009). Les fleurs, brunâtres, constituent de denses grappes et apparaissent de mars à mai. Elles sont à l'origine de petites drupes rouges (Figure 11), puis noires à maturité, subglobuleuses. Le mastic est une résine naturelle qui est semi-obtenue comme un exsudat du tronc de l'arbuste de *P. lentiscus*. Le mastic a été utilisé dans des essais cliniques sur des patients souffrant d'ulcères peptiques (Boullard, 2001 ; Belfadel, 2009).). L'administration du mastic (1 g par jour) soulage la douleur et guérit l'estomac et l'ulcération duodénale dans la majorité des malades dans les deux semaines suivant l'administration.



**Figure 11** : photographies de fruits (A), feuilles (B) et fleurs (C) de *Pistacia lentiscus* (Koutsoudaki et al ,2005)

### II.2 Description taxonomique de *Pistacia lentiscus* (Maameri, 2014)

La classification taxonomique de *P. lentiscus* est résumée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau I:** Classification taxonomique de *Pistacia lentiscus*

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>
Nom vernaculaire berbère	Tidekt

### II.3 Utilisation thérapeutique traditionnelle

- **Les feuilles** du lentisque sont utilisées sous forme d'infusion, ou décoction, pour guérir les troubles gastro-intestinaux, traitement de l'eczéma, la diarrhée et les infections de la gorge, et comme un puissant antiulcéreux (**Saïd et al., 2002**).
- **La résine** de Pistacia a été utilisée par les guérisseurs traditionnels pour le soulagement des douleurs abdominales, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal (**Bammou et al., 2014**).
- **l'Essence des feuilles et rameaux de ces partie** est extraite une huile essentielle qui est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, prescrite aussi pour traiter les problèmes veineux dont les hémorroïdes (**Boukeloua, 2009**).
- **Mastic** ; est souvent cité comme un remède efficace contre certaine maladie, tel que l'asthme, diarrhée, infection bactérienne, ulcère gastro-duodéaux (**Marone et al., 2001 ; Tuzlaci et al., 2001**).
- **L'huile** : L'huile de lentisque est souvent utilisée en médecine comme astringent, expectorant, et cicatrisant (**Seigue, 1985**).

### II.4 Extraction

La plante a été récoltée en juillet 2015 dans la forêt d'Azru n'Bechar dans la région d'Amizour (wilaya de Bejaia),

Les feuilles et fruits de *Pistacia lentiscus* ont été séchés, dans un endroit ombragé et aéré, broyés et tamisés pour récupérer à la fin une poudre fine pour les feuilles et une pate homogène pour les fruits.

Dans notre étude, une extraction sélective à plusieurs solvants a été entreprise selon le protocole de (**Chiang et al ,1994**) modifiée par **Atmani et al ., 2009**).

La poudre fine de la plante Pistacia 100g pour Pistacia feuilles et 160g pour Pistacia graines ont été macérés dans l'éthanol à 95% pendant 24h à un rapport de 1gramme de poudre pour 4 ml de solvant. Après décantation de la solution une centrifugation de 1500g/ min a été effectuée. Le surnageant a été séché au rota vapeur (Heidolph, Germany).

## II.5. Test de génotoxicité

### II.5.1. Souche bactérienne utilisée

La souche qui a été utilisée pour déceler l'activité génotoxique des extraits de *Pistacia lentiscus* est *Escherichia coli* WP2 (pKM101) décrite par Green et Muriel (1976). Cette souche a été obtenue du laboratoire de Toxicologie (université de Bourgogne, France). La souche a été conservée à -80°C dans des Eppendroff stériles.

Son génotype est noté dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II: Génotype de la souche *E. coli* Wp2/Pkm101**

<b>Mutation gène TrpE65</b>	Auxotrophe au tryptophane	+
<b>Mutation rfa</b>	Augmentation de la perméabilité membranaire	+
<b>Plasmide pKM101</b>	Résistance à l'Ampicilline	+
<b>Mutation UvrA</b>	Système de réparation UvrA	-

- **Mutagènes**

Un mutagène direct le méthyl méthane sulfonate (MMS) aux doses de (8 et 16µg /ml) a été utilisé pour le test sans activation métabolique, et un mutagène indirect le 2-Aminofluoréne (2-AF) à différentes doses: 40 et 80 µg/ml en présence de la fraction S9 (activation métabolique) (Di sotto *et al.*, 2012).

- **Préparation des suspensions bactériennes**

Dans 10 ml de bouillon nutritif, on a inoculé 100 µl d'une culture de souche *E.coli* WP2 (pKM101) et 200 µl d'ampicilline (8mg/ml). Cet inoculum a été incubé à 37°C pendant 15-16 h pour atteindre une concentration approximative de  $2 \times 10^9$  bactéries/ml.

- **Contrôle du génotype.**

Afin de vérifier le génotype de la souche bactérienne *E. coli* WP2 (pKM101) par rapport aux mutations citées dans le tableau, les tests suivants ont été menés.

- **Auxotrophie au tryptophane**

Le test utilise une souche mutée (Trp E65) rendue auxotrophe vis-à-vis du tryptophane (Trp<sup>-</sup>) c'est-à-dire que les bactéries mutantes *E. coli* WP2 (pKM101) ne peuvent pas se développer en absence de cet acide aminé. Pour vérifier cette Auxotrophie, 100µl de tryptophane (0,05 mM) sont appliqués au râteau sur la surface du milieu minimal. Après ensemencement par la technique en strie, la boîte est incubée à 37°C pendant 48h. La souche *E. coli* WP2 PkM101 doit croître en milieu riche en tryptophane, inversement aucune croissance n'est observée en son absence (**De Marini, 1991**)

- **Mutation *rfa***

Afin de confirmer la présence de la mutation *rfa* (augmentation de la perméabilité membranaire), un test de sensibilité au cristal violet a été entrepris. Pour ce test, un disque de papier filtre stérile contenant 10µl de cristal violet (1mg/ml) est placé sur la surface des boîtes de gélose nutritive ensemencées.

Après 48h d'incubation, une zone claire d'inhibition (environ 14mm) doit apparaître autour du disque indiquant que le cristal violet a pu pénétrer dans la cellule mutante et exercer une activité antibactérienne (**Ames et al., 1973 ; Araki, 1994**).

- **Présence du plasmide pKM101**

Afin de vérifier la présence du plasmide pKM101 conférant à la souche *E. coli* WP2 pKM101 la résistance à l'ampicilline, un disque de papier filtre stérile contenant 10µl d'ampicilline (8mg/ml) est placé sur la surface d'une gélose nutritive ensemencée. Aucune zone d'inhibition ne doit être trouvée autour du disque d'ampicilline démontrant la résistance à cet antibiotique (**Wright and Bridges, 1980**)

- **Sensibilité aux UV (mutation UvrA)**

L'absence de la mutation UvrA de la souche *E. coli* WP2 PkM101 peut être confirmée en démontrant l'absence de sensibilité aux UV. Après ensemencement des boîtes de gélose nutritive, la moitié d'une boîte bactérienne ensemencée par la culture bactérienne a été recouverte de papier aluminium stérile, puis irradiée avec une lampe germicide (à UV 15W) à une distance de 33cm et à une longueur d'onde de 254 nm. Après incubation de 24h à 37 ° C, les colonies bactériennes doivent apparaître sur les deux moitiés de la boîte. (**Witkin, 1974**).

### II.5.1 Système d'activation métabolique

- **Préparation de la fraction S9**

Dans le but d'activer le métabolisme de leurs foies, des rats mâles (200g) ont été injectés par un produit chimique Arocolor 1254 (500mg/kg) cinq jours avant le sacrifice (**Maron et Ames, 1983**). Au cinquième jour, les rats ont été sacrifiés et leur foies prélevés. Ce dernier ont été lavés plusieurs fois avec du KCl (0,15M) et transférés dans des creusets. Les foies ont été broyés avec un mortier dans 3 ml/g foie. L'homogénat résultant est mis dans une centrifugeuse pendant 10 min à 9000 rpm. Le surnageant est ensuite prélevé et stérilisé en le filtrant. La fraction S9 préparée a été distribuée dans des eppendroff stériles qui ont été stockés immédiatement à -80°C.

- **Préparation du S9 Mix**

Le S9 mix est composé de la fraction S9 (10%) additionnée à une solution saline de MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (32,5 mM) jouant le rôle de cofacteur. Cette solution a été stérilisée à l'aide d'un filtre (0,45µm), tampon phosphate (0,2 M à pH=7,4), Glucose-6-phosphate (1M), et NADP (0,1M) (**Maron et Ames, 1983**).

Le glucose et le NADP sont pesés dans un tube stérile puis le tampon phosphate froid est rajouté. Après dissolution adéquate du mélange, la solution saline et le S9 mix sont rajoutés.

## II.5.2. Tests de Mutagénicité/Antimutagénicité

### II.5.2.1. Test de mutagénicité (Test d'Ames)

Au cours de cette étude, le test de mutagénicité par la méthode d'incorporation direct a été réalisé, en présence puis en absence de l'activation métabolique (S9 Mix). Le protocole suivi est celui décrit par Maron et Ames (1983), pour évaluer la mutagénicité d'une substance chimique, avec quelques modifications portées par Green et Muriel (1984). Les essais ont été réalisés sur la souche *E. coli* WP2 (pKM101) pour évaluer la mutagénicité de l'extrait brut des feuilles et fruits de *Pistacia lentiscus*.

- **Principe du test**

La souche *E. coli* WP2 pKM101 est mise en présence de la substance mutagène à tester avec ou sans activation métabolique (fraction S9 du foie de rat). Ce mélange est mis à incuber 48h à 37°C. Si une mutation réverse (trp<sup>-</sup> en trp<sup>+</sup>) est induite par la molécule testée, les bactéries se développent en colonies sur un milieu minimal.

### Test d'Ames

Du top agar a été reparti dans des tubes en verre stériles et maintenus entre 43-48°C. Au 2,5ml de top agar, 100µl de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) ont été rajouté, 100µl Na Cl (0,9%) pour le contrôle négatif, le mutagène pour le contrôle positif ou l'extrait de *P. lentiscus* (50, 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/ml), 500 µl de la solution tampon (0,1M) pour le test sans activation métabolique (-S9), ou 500µl de S9 mix en présence d'activation métabolique (+S9). Le contenu des tubes à essai est homogénéisé (vortex) et versé sur des boites de Pétri de milieu minimal qui sont laissé à sécher pendant 2 à 3 minutes, puis inversés et placés dans un incubateur à 37°C pendant 48 h. Le nombre des révertants spontanés ont été dénombrés à l'aide d'un compteur de colonies de la marque (Stuart). Le rapport de mutagénicité (RM) a été calculé par la formule suivante :

**RM**=Nombre de révertants /Contrôle négatif .

Si le RM >2, la substance chimique où l'extrait de plante est mutagène.

La procédure expérimentale est résumée dans le tableau suivant:

**Tableau III:** méthodologie du test mutagénique

	E. coli wp2 pKM101	NaCl	tampon	Mutagène (-S9) (MMS)	Mutagène (+S9) (2-AF)	Extrait (PF, PG)
Contrôle négatif	+	+	+	-	-	-
Contrôle positif	+	-	+	+	-	-
Test	+	-	+	-	-	+

MMS : methyl methane sulfonate ; 2-AF : 2 Aminofluoréne

### II.5.2.2. Test d'anti-mutagénicité

Cet essai a été effectué par la méthode de pré-incubation. Cette méthode est basée sur le mélange de l'extrait et le mutagène en même temps et l'incubation avec les bactéries à 37°C pendant 30min.

En effet, la souche *E. coli* WP2 (pKM101) a été pré-incubée à 37°C pour une durée de 30 min en association avec 100 µl de mutagène et d'extrait, et 500 µl du mélange S9 pour le test (+S9), 500 µl de la solution tampon phosphate (0,1 M) pour le test sans S9 (-S9). Après la pré-incubation, 2,5 ml de top agar a été ajouté à chaque tube. Ce mélange a été homogénéisé puis versé sur des boîtes de Pétri de milieu minimal. Après incubation à 37°C pendant 48 h, le nombre de révertants spontanés a été dénombré à l'aide d'un compteur de colonies (Stuart). Le pourcentage d'antimutagénicité a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'antimutagénicité} = 100 - [(T / M) * 100]$$

T étant le nombre de révertants par boîte en présence de mutagène et l'extrait en même temps et M le nombre de révertants en présence juste du mutagène.

Selon (Neigi *et al.*, (2003) l'effet d'antimutagénicité a été considéré moyen quand le pourcentage d'inhibition de la mutagénicité des composés testés était dans la gamme 25-40%, et fort quand l'effet inhibiteur dépassait les 40%. Par contre, quand l'effet inhibiteur était inférieur à 25%, ceci a été considéré faible (Di Sotto *et al.*, 2012). Les contrôles négatifs est préparés de façon similaire au test de mutagénicité, Dans le contrôle positif, l'extrait est remplacé par le NaCl (0,9%). La procédure expérimentale est résumée dans le tableau suivant :

**Tableau IV:** méthodologie du test antimutagénique

	<i>E. coli</i> wp2 pKM101	NaCl	tampon	Mutagène (-S9) (MMS)	Mutagène (+S9) (2-AF)	Extrait (PF, PG)
Contrôle négatif	+	+	+	-	-	-
Contrôle positif	+	-	-	+	+	-
Le test	+	-	-	+	+	+

MMS : methyl methane sulfonate ; 2-AF : 2 Aminofluoréne

### II.3 Analyse statistique

Tous les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD (n=2).les résultats obtenus ont été analysés en utilisant le logiciel Graph-Pad Prism (version 5.3).

### III. Résultats et discussion

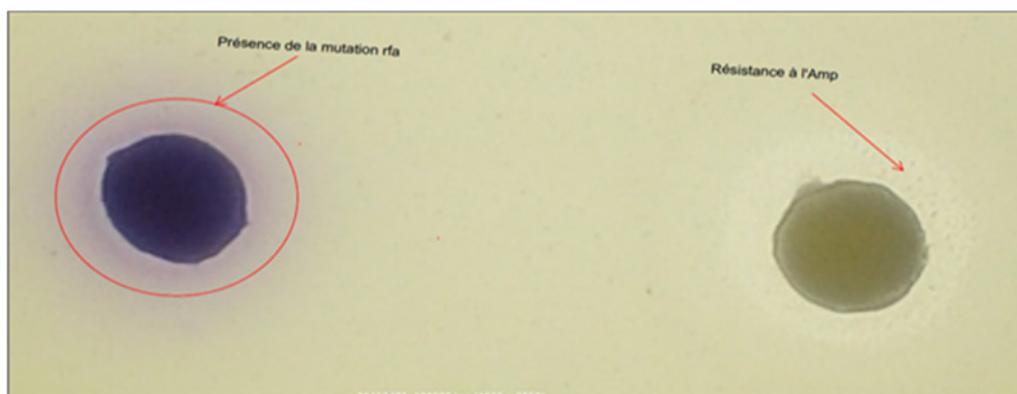
La souche bactérienne *E. coli* WP2 pKM101 auxotrophe pour le tryptophane ( $\text{Trp}^-$ ) a été cultivée sur un milieu minimal ne contenant pas cet acide aminé (le tryptophane). Seules les bactéries qui ont subi une mutation spontanée ( $\text{Trp}^-$  à  $\text{Trp}^+$ ) conduisant à des colonies phototrophes pour cet acide aminé ( $\text{Trp}^+$ ) vont croître sur ce milieu pour former des colonies visibles (Figure 12). Le nombre de colonies qui ont survécu ne dépasse pas le nombre de révertants spontanés (163) ce qui confirme l'auxotrophie de la souche utilisée pour le tryptophane.



**Figure 12:** la croissance d'*E. coli* dans un milieu minimal riche en tryptophane.

#### III.1. Présence du plasmide pKM 101 et mutation *rfa*

L'inhibition de la croissance bactérienne dans la zone qui entoure le disque qui contient le cristal violet indique une mutation *rfa* qui modifie les propriétés de la paroi bactérienne en augmentant sa perméabilité au cristal violet (Figure 13).

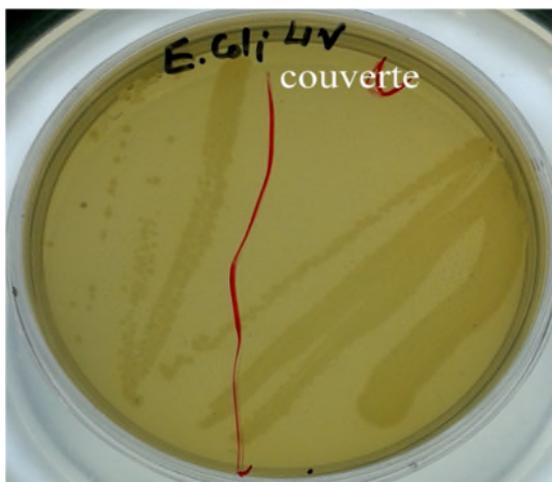


**Figure 13:** L'inhibition de la croissance bactérienne dans les zones qui entourent les disques qui contiennent l'ampicilline et le Cristal violet.

Par contre, malgré une zone d'inhibition de 20mm autour du disque d'ampicilline (8mg/ml), la présence de colonies autour de ce disque confirme la présence du plasmide pKM101 qui confère à la souche la résistance à l'ampicilline.

### III.2.Sensibilité aux UV

Un test a été mené pour confirmer que la souche *E. coli* WP2 pKM101 n'avait pas subi une mutation *uvrA* qui la rend sensible aux UV. Ce test qui consiste à exposer la moitié d'une culture bactérienne d'*E. Coli* WP2 pKM101 aux rayons UV alors que l'autre moitié a été couverte pour la protéger contre ces rayons a montré que dans la partie exposée, des colonies ont poussé aussi bien que dans la partie non exposée (Figure 14). L'exposition de *E. coli* WP2 pKM101 aux rayons UV endommage fortement l'ADN en créant des dimères de pyrimidine qui empêchent une réplication normale de l'ADN ce qui conduit à l'accumulation d'ADN simple brin. Le gène *uvrA* fait partie du système de réparation d'excision de nucléotides pour exciser ces dimères et réparer les dommages à l'ADN. Si ce gène était déficient, la souche aurait développé une hypersensibilité aux UV et par conséquent n'aurait pas survécu en présence des rayons UV. Les résultats illustrés dans la (figure 14) montrent une croissance normale de colonies bactériennes dans la partie qui a été exposée aux UV ce qui confirme l'absence de la mutation *uvrA* chez la souche *E. coli* WP2 pKM101.



**Figure 14:** Croissance de colonies dans la moitié couverte et non couverte de la boîte de Pétri contenant une culture bactérienne de *E. coli* WP2 pKM101.

### III.3. Test de mutagénicité

- **Sans activation métabolique**

Dans cette étude, les extraits de feuilles et graines (fruits) de *Pistacia lentiscus* ont été évalué pour leur effet mutagène par le test de Ames en utilisant une souche bactérienne spécifique *E. coli* wp2 (pKM101) qui porte une mutation AT au niveau d'un site de mutation critique dans le gène du *trpE*. Cette mutation rend la souche auxotrophe pour le tryptophane. Les résultats de ce test sont résumés dans le Tableau V.

- **Contrôle négatif**

Ces résultats montrent que lorsque la souche bactérienne *E. coli* WP2 pKM101 est cultivée sur un milieu minimal d'agar ne contenant pas la dose d'acide aminé nécessaire (*trp*) et sans la présence d'un mutagène (contrôle négatif), seuls les révertant ( $\text{Trp}^+$ ) vont croître pour former des colonies visibles. Le nombre de révertants spontanés dans la boîte de pétri est relativement constant ( $132 \pm 12,02$ ) et constitue le control négatif. Ce résultat concorde avec les résultats d'Ames (**Maron and Ames, 1983**) qui a postulé que le nombre de révertants spontanés doit varier entre une valeur minimale de 123 et une valeur maximale de 140 par boîte.

- **Contrôle positif**

Cependant, quand on ajoute un agent mutagène (**MMS**) à différentes concentrations (8 et 16µg/ml), le nombre de colonies révertants par boîte est augmenté, généralement d'une manière liée à la dose du mutagène et reflétée par le rapport de mutagénicité ( $R/M^a$ ) (Tableau V) c'est le control positif. En effet, quand le mutagène MMS a été utilisé, le rapport de mutagénicité semble dépendre de la dose du mutagène puisqu'à 8 et 16 µg/ml de mutagène une différence significative a été notée entre les rapports respectifs de mutagénicité (2,68 et 3,49). Selon **Maron et Ames (1983)**, si le rapport de mutagénicité est supérieur à 2, l'agent testé est mutagène ce qui été le cas pour le **MMS**. Ce dernier est un agent alkylant qui rajoute un groupe methyl à la guanine de l'ADN pour créer des transitions ou transversions qui inversent la mutation originale au site du trp de la souche *E .coli* WP2 pkM101, la rendant de nouveau phototrophe pour cet acide aminé.

- **Mutagénicité des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus***

Dans le cas des feuilles et graines de *P. lentiscus* et en l'absence du S9 mix, les rapports de mutagénicité à toutes les concentrations testées pour les deux extraits sont inférieurs à 2 (tableau V) indiquant l'absence de mutagénicité de ces extraits. Cependant, il est important de noter que le rapport de mutagénicité pour les feuilles a augmenté avec les concentrations testées jusqu'à atteindre une stabilité entre 400 et 800µg/ml et baisser à 1000µg/ml. Cette observation peut être interprétée par le fait qu'une augmentation de la concentration de l'extrait peut affecter la capacité de ses constituants polyphénoliques à pénétrer à travers la membrane bactérienne dû à un encombrement stérique. La même observation est valable pour les graines avec une stabilité du rapport de mutagénicité à 400µg/ml qui ne baissera pas même à 1000µg/ml.

**Tableau V:** Effets mutagènes des extraits ethanologiques de *Pistacia lentiscus* (feuilles et graines) sans activation métabolique (-S9)

Traitement	Doseµg/ml	Mutagénicité sans S9	
		Nombre de révertants	RM
<b>C-</b>	-	132±12,02	-
<b>C+</b>	8 µg/ml	342±6,36	2,68
<b>MMS</b>	16 µg/ml	416±4,03	3,49
<b>PF</b>	50µg/ml	60,5± 3,53	0,45
	100µg/ml	75±14,14	0,56
	200µg/ml	95±4,24	0,71
	400µg/ml	119,5±4,94	0,90
	800µg/ml	112,5±9,19	0,85
	1000µg/ml	98,5±10,60	0,74
<b>PG</b>	50µg/ml	70,5± 4,94	0,53
	100µg/ml	83,5±6,36	0,63
	200µg/ml	128±4,24	0,94
	400µg/ml	133,±5,65	1
	800µg/ml	122,5±2,12	0,92
	1000µg/ml	119±8,48	0,90

**C<sup>-</sup>** : Contrôle négatif; **C<sup>+</sup>** : Contrôle positif ;**MMS** :Methyl methane sulfonate ; **R/M** : Rapport mutagénique; **PF**: Pistacia feuilles; **PG**: Pistacia graines.

### III.3.2.Avec activation métabolique (+S9)

- **Contrôle négatif**

Les résultats des moyennes des révertants spontanés pour le contrôle négatif (Tableau VI) ont été trouvés: 119,5 en présence de l'activation métabolique, une différence considérée non significative, et en accord avec la marge de normalité (123-130) de révertants spontanés postulée par Ames ((Maron and Ames, 1983).

**Tableau VI:** Effets mutagènes des extraits ethanoliques de *Pistacia lentiscus* (feuilles et graines) avec activation métabolique (+S9)

Traitement	Dose µg/ml	Mutagénicité avec S9	
		Nbr de révertants	Rapport mutagénicité
C-	0	119,5±6.36	-
C+ (2AF)	40 µg/ml	187±4.24	2,28
	80 µg/ml	212±2.24	2,58
PF	50µg/ml	81±4,24	0,67
	100µg/ml	102,5±14,84	0,85
	200µg/ml	112 ,5±14,84	0,94
	400µg/ml	115,5±12,02	0 ,96
	800µg/ml	128,5±3,53	1,07
	1000µg/ml	122,5±2,12	1,02
PG	50µg/ml	92,5±7,78	0,77
	100µg/ml	89,5±9,19	0,74
	200µg/ml	129,5±3,53	1,08
	400µg/ml	109,5±7,78	0,91
	800µg/ml	125±5,65	1,04
	1000µg/ml	109±9,89	0,91

**C<sup>-</sup>** : Contrôle négatif; **C<sup>+</sup>** : Contrôle positif. **2AF** : 2 Aminofluoréne; **R/M** : rapport mutagénique; **PF**: Pistacia feuilles; **PG**: Pistacia graines

- **Contrôle positif**

Le traitement de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) par le mutagène (2AF) avec les concentrations de 40 et 80µg/ml, en présence d'une activation métabolique reflète un nombre très significatif ( $P^{***} < 0,0001$ ) de révertants tryptophane ( $trp^- \rightarrow trp^+$ ) par rapport au contrôle négatif, avec des rapports de mutagénicité de 2,28 et 2,58 à 40 et 80µg/ml, respectivement (Tableau VI). Ces rapports qui augmentent avec la dose du mutagène sont supérieurs à 2 ce qui confirme la mutagénicité du 2AF en présence de l'activation métabolique. En effet, ce dernier mutagène est activé métaboliquement par le cytochrome P450 qui le rend électrophile et par conséquent joue un rôle de radical libre qui provoque des mutations à l'ADN (Transitions) (Parke *et al.*, 1991).

- **Mutagénicité des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus***

En présence du S9 qui est un extrait de foie qui contient des enzymes comme le cytochrome P-450, l'époxyde hydrolase, l'UDPG transférases et estérases et glutathion S-transférases (Picard, 2005) qui pourraient activer métaboliquement les composés phénoliques des deux extraits de plante en les rendant mutagènes, le rapport mutagénique est toujours inférieur à 2 (Tableau VI), ce qui confirme la non-mutagenèse de la plante même à des concentrations élevées. Cependant, on observe une élévation significative de ces rapports mutagénique comparé à ceux notés sans le S9 (Tableau VI). Cela signifie que les enzymes du S9 peuvent modifier certains composés phénoliques de ces deux extraits, mais pas suffisamment pour augmenter les rapports mutagénique au dessus de 2. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour d'autres plantes médicinales telles que *Bidens pilosa*, *Cleistopholis paterns* et *Tetrapleura tetraptera* (Chang-Eui Hong, 2011) où le test de Ames n'a montré aucun effet génotoxique de ces plantes, en présence ou non du mélange S9. D'autres plantes ont présenté un résultat positif avec le test de Ames pour la présence de la génotoxicité comme l'extrait hydroalcoolique de *Ocotea duckeiby* ce qui révèle que cette plante peut être considérée dangereuse pour la santé humaine (Marques *et al.*, 2003).

Certains auteurs ont testé l'effet mutagène de deux composés phénoliques isolés de *P. lentiscus* récoltée en Tunisie, l'acide gallique et le pentagalloylglucose (Abdelwahed *et al.*, 2007) par l'essai de comet et ont déduit que ces composés n'ont aucun effet génotoxique ce qui est en parfait accord avec nos résultats. L'absence de mutagénicité des deux extraits de *Pistacia lentiscus* présente un intérêt phytopharmaceutique important vu que cette plante est

largement utilisée par la population locale et peut présenter un intérêt pour l'industrie pharmaceutique.

### **III.4. Résultats du test d'anti-mutagenicité**

L'activité antimutagénique des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus* à des concentrations différentes (50, 100, 200µg/kg) a été examinée sur la souche *E.coli* WP2 (pKM101) contre les agents mutagènes: méthyle méthane sulfonate (MMS : 8, 16µg /ml) et le 2-aminofluorène (2AF :40, 80µg /ml) en absence et en présence d'activation métabolique (S9), respectivement.

#### **III.3.3. Sans activation métabolique**

- **Contrôle positif**

Les résultats du tableau (VII) montrent que pour le contrôle positif, le mutagène MMS aux concentrations de 8 et 16 µg/ml présente un effet mutagénique très significatif ( $p^{***} < 0001$ ) avec des RM respectifs de 2,21 et 2,49 indiquant encore une fois une dose-dépendance de cette mutagenicité.

**Tableau VII:** Résultats du test d'anti-mutagénicité des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus* sur la souche *E. coli* pKM101 sans S9 contre le MMS

Traitement	Doses µg/ml	Antimutagénicité sans S9		
		Nbr de révertants	RM	% d'inhibition
<b>C</b>	0	89, 39±1,96	-	
<b>C<sup>+</sup> (MMS)</b>	8µg/ml	198±9 ,98	2 ,21	-
	16µg/ml	223 ±4,24	2,49	-
<b>PF+8µg/ml</b>	50µg/ml	104± 5,65	1,18	47,5
	100µg/ml	87±5,65	1,04	56,06
	200µg/ml	79±1,41	0,80	60,1
<b>PF+16µg/ml</b>	50µg/ml	106±1 ,41	1,16	52,4
	100µg/ml	93,5± 3,53	0,97	58,3
	200µg/ml	72 ±2 ,82	0,88	67,7
<b>PG+8µg/ml</b>	50µg/ml	123 ±4,24	1,37	37,9
	100µg/ml	116±1,41	1,25	41,4
	200µg/ml	112±2 ,82	1,23	43,4
<b>PG+16µg/ml</b>	50µg/ml	120±7,07	1,34	46,2
	100µg/ml	116±8,48	1,29	48
	200µg/ml	106±1,41	1,16	52,5

**C** : control négatif, **C<sup>+</sup>**: control positif, **RM** : rapport mutagenique, **TI** : taux d'inhibition, moyenne, , **PF** : Pistacia feuilles , **PG** : Pistacia graines

- **Antimutagénicité des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus***

L'effet anti-mutagénique des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* a été aussi examiné en pré-incubant la bactérie avec le MMS (-S9) en présence de l'extrait. Les concentrations de l'extrait sont choisies (50, 100 et 200µg/ml) sur la base des tests

mutagéniques étant donné qu'à partir de 200µg/ml un rapport mutagénique maximal a été observé.

Les résultats du tableau VII montrent que l'extrait de feuilles de *Pistacia* réduit la mutagénicité induite par le MMS (8µg/ml) de manière dose-dépendante avec des pourcentages d'inhibition de la mutagénicité de 47,5 ; 56 ; et 60% à des concentrations de 50, 100 et 200µg/ml. A la même concentration du mutagène (MMS), l'extrait de *Pistacia* graines présente des pourcentages d'inhibition moins importants que ceux affichés par les feuilles et qui varient entre 37,9 et 43,4% pour les concentrations testées (entre 50 et 200µg/ml). De même, à une dose plus élevée du mutagène (MMS 16µg/ml), une forte anti-mutagénicité qui dépasse celle démontrée (Tableau VII) à 8µg/ml est observée. Cette anti-mutagénicité suit le même schéma qu'à 8µg/ml avec une réduction de mutagénicité plus significative pour les feuilles que pour les graines et une dose-dépendance pour les deux parties de la plante.

### **III .4.Avec activation métabolique**

L'effet anti-mutagénique des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* a été aussi examiné en pré-incubant la bactérie avec le 2AF en présence du S9 (+S9) .

- **Control positif** : D'après les résultats illustrés dans le tableau VIII, l'agent mutagène (2AF) aux concentrations de 40 et 80 µg/ml a exhibé un effet mutagénique très significatif avec des rapports mutagéniques respectifs de 2,26 et 2,74 confirmant sa génotoxicité en présence d'enzymes oxydantes du foie comme le cytochrome P450.

**Tableau VII:** Résultats du test d'anti-mutagénicité des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus* sur la souche *E. coli* pKM101 avec S9 contre le 2AF

Traitement	Doses µg/ml	Anti-mutagénicité avec S9		
		Nbr de révertants	RM	%d'inhibition
<b>C<sup>-</sup></b>	0	135,5±7,77	-	-
<b>C<sup>+</sup> (2AF)</b>	40µg/ml	306,5±10,60	2,26	-
	80µg/ml	372,5±11,3	2,74	-
<b>PF+40µg/ml</b>				
	50µg/ml	167±0	1,23	45,5
	100µg/ml	154,25±0	1,13	49,7
	200µg/ml	145,5±0	1,07	52,5
<b>PF+80µg/ml</b>				
	50µg/ml	221±0	1,63	40,7
	100µg/ml	201±0	1,48	46,04
	200µg/ml	198,5±0	1,46	46,7
<b>PG+40µg/ml</b>				
	50µg/ml	157±7,78	1,15	50,6
	100µg/ml	151,5±6,36	1,11	50,57
	200µg/ml	148±2,12	1,09	51,7
<b>PG+80µg/ml</b>				
	50µg/ml	134±59,19	0,98	64
	100µg/ml	142±6,36	1,04	61,8
	200µg/ml	154,5±9,19	1,14	58,5

Les résultats représentent la moyenne±écart-type de deux expériences séparées (n=2) C<sup>-</sup> : control négatif, C<sup>+</sup> : control positif, R/M : rapport mutagénique, 2AF : Aminofluoréne, PF : Pistacia feuilles, PG : Pistacia graines

- **Anti-mutagénicité des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus***

A 40µg/ml du 2AF et en présence du S9, le nombre de révertants diminue en augmentant la dose d'extrait de feuilles ce qui présente un taux d'inhibition qui varie entre 45,5 et 52,5% (pour des concentrations allant de 50 à 200µg/ml, respectivement) (Tableau VII), qui est

considéré comme un taux d'inhibition de la mutagénicité assez fort (Neigi *et al.*, 2003). A la même concentration du mutagène, l'extrait de graines a montré aussi une diminution du nombre de révertants par rapport au contrôle positif, plus remarquable que celui des feuilles. Cet extrait a exhibé un fort taux d'inhibition de la mutagénicité qui varie de 50,6 à 51,7%, caractérisé par une non dépendance de la dose. A la concentration de 80 µg/ml du mutagène, l'extrait de feuilles a montré un taux d'inhibition de la mutagénicité moins fort qu'à 40µg/ml indiquant probablement une saturation du pouvoir de protection des constituants polyphénoliques contre les dommages induits par le 2AF. Par contre, l'inverse est observé pour l'extrait de graines qui réduisent plus fortement le taux de mutagénicité mais avec une diminution d'efficacité quand la concentration de l'extrait augmente. Ceci peut être expliqué par un encombrement stérique qui empêche les constituants de la plante à passer à travers la membrane cellulaire d'E. *Coli*.

### III.5.Discussion générale

Les résultats obtenus montrent que le rapport mutagénique du contrôle positif (sans extrait) dans le test antimutagénique est supérieur à 2 à cause des mutagènes utilisés (MMS et 2AF). Ce rapport baisse significativement quand on incube les bactéries avec les extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus* en présence des deux mutagènes, ce qui signifie que les extraits de cette plante protègent l'ADN d'E. *Coli* wp2 (pKM101) contre l'effet mutagène des agents chimiques utilisés. En présence du 2AF et de l'activation métabolique, il s'est avéré que l'extrait des feuilles est moins efficace que celui des graines ce qui nous amène à assumer que les constituants des feuilles sont moins efficace pour contrer les dommages à l'ADN induits par le 2AF. Par contre, l'extrait des feuilles a exhibé un pouvoir antimutagénique plus élevé que celui des graines.

Cette protection est probablement due à la richesse de *Pistacia lentiscus* en composées phénoliques à activité antioxydante très forte. En effet, l'activité antioxydante des extraits de feuilles de *P. lentiscus* a été démontrée par des études précédentes (Atmani *et al.*, 2009). Cette étude a démontré des effets anti-radicalaires contre le DPPH, une élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est une source de radicaux libres délétères tels qu'OH et O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Aussi, les feuilles de cette plante ont révélé un potentiel contre la peroxydation lipidique de l'acide linoléique (Atmani *et al.*, 2009).

En effet, les feuilles de *Pistacia lentiscus* contiennent des tanins proanthocyanidiques et galliques (**Baudoux, 2003; Grosjean, 2007**), des flavonols glucosidiques comme la myricetine rhamnoside et la quercetine 3-O-rhamnoside (**Remila et al., 2015**) alors que les graines de *Pistacia lentiscus* contiennent des anthocyanines, essentiellement: cyanidine 3-O-glucoside (70%), delphinidine 3-O-glucoside (20%) et cyanidine 3-O-arabinoside (10%) (**Ferradji., 2010**). Les flavonols glycosidiques sont connus pour leurs propriétés antioxydantes à cause de leur structure (groupements OH et 2, 3 liaison double) (**Meterc et al., 2008**). La myricetin rhamnoside qui est un composé majeur des feuilles a démontré une capacité scavenging élevée contre le DPPH (**Adebayo, 2011**).

Cependant, l'effet anti génotoxique n'est pas attribué seulement à l'effet anti-radicalaire directe des composés phénoliques de la plante. Certains, comme l'acide gallique, exercent leur effet antimutagène parce qu'il augmente la transcription de gènes d'enzymes antioxydantes comme la thioredoxine réductase et la glutathion peroxydase (**Abdelwahed et al., 2007**). En effet la thioredoxine réductase impliquée dans la régulation d'oxydo-réduction de la cellule a été exprimée dans les cellules traitées à la fois avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et AG (**Abdelwahed et al., 2007**)

De même, l'acide gallique (AG) et le pentagalloylglucose (PGA) qu'on trouve dans *P. lentiscus*, et les flavonoïdes peuvent agir par l'inhibition des effets mutagènes des agents chimiques utilisés en piégeant les électrophiles par réaction ou conjugaison chimique (**Abdelwahed et al., 2007**). Donc, ce mécanisme est responsable de l'effet protecteur des flavonoïdes en raison de leur capacité de transfert des électrons à des radicaux libres.

En outre, l'acide gallique est aussi impliqué dans la modulation d'un certain nombre d'enzymes de réparation de l'ADN, comme la polymérase AP endonucléase (APEX) qui répare les dommages oxydatifs de l'ADN, et la ligase 4 (LIG4) et l'ADN-3-méthyladenine glycosidase (MPG), était plus élevée dans les cellules traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et AG (**Abdelwahed et al., 2007**).

Plusieurs plantes médicinales étudiées comme *Murraya koenigii* (**Zahin et al., 2013**) ont prouvé leur pouvoir antimutagène (<70%) contre la présence d'agents alkylants comme le MMS et d'autres comme le 2AF. Le pouvoir anti-mutagenique de l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* s'est avéré moins fort que celui de cette plante.



### Conclusion et perspectives

Un grand nombre d'espèces de plantes sont une grande source de composés biologiquement actifs dont l'effet sur la santé humaine ou le matériel génétique est pratiquement inconnue. L'utilisation d'infusions de plantes pour guérir de nombreux types de maladies différentes est très commun dans la médecine populaire. Ils remplacent souvent des médicaments modernes. Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt dans les enquêtes sur les composés issus de plantes et leurs effets génotoxiques, pour s'assurer de l'absence de risque de leur utilisation.. Il existe de nombreux tests qui permettent d'évaluer la mutagénicité des substances chimiques y compris le test d'Ames. Ce dernier est utilisé dans le monde entier pour déterminer le potentiel mutagène de nouveaux produits chimiques parce qu'il a une valeur prédictive élevée de cancérogénicité.

L'absence d'une réponse mutagène par les extraits éthanoliques de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* contre la souche de *E. coli* WP2 pKM 101 est une étape positive dans la détermination de l'utilisation de cette plante en toute sécurité. Les tests d'antimutagénicité ont montré un pouvoir plus élevé des graines par rapport aux feuilles en présence du 2AF alors que l'extrait de feuilles possède une forte antimutagénicité contre le MMS par rapport à celui des feuilles.

La détermination de l'anti-mutagénicité des extraits végétaux est importante dans la découverte de nouveaux traitements anticancéreux efficaces.

En perspective, il serait donc intéressant d'évaluer la génotoxicité des extraits de plante avec d'autres tests complémentaires tels que le test de comet.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelwahed,A.Bouhleb,I.Skandrani,I.,Valenti,K.,Kadri,M.,Guiraud.,P.,Steiman,R Mariotte,A.M.,Dijoux-Franca,M,G.,Ghedira,k.,Chekir-Ghedira,L., Laporte,L., Mariotte,A.M., .(2007). Study of Antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6 pentagalloylglucose from Pistacia lentiscus Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions*, 165: 1–13.
- Araki, A., Kato, F., Matsushing, T., Noguchi, T.(1994).Improved methods for mutagenicity testing of gaseous compound by using a gas sampling bag. *Mutation Research*, 307:335-344.
- Atmani D., Ayouni K., Berboucha M., Boudaoud, H., Debbache N, Lounis, H.(2009). Antioxidant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, *Food Chemistry*, 112:303–309.
- Atoyebi,I.T., Oyeyemi,B.A.,Daudaand,A.Bakare,A.(2015).Genotoxicity and anti-genotoxicity of aqueous extracts of herbal recipes containing Luffa cylindrica (L), Nymphaea lotus (L) and Spondias mombin (L) using the Allium cepa (L) assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(15): 492-499.
- Belfadel, F.Z Bahri, L., Belkheri A., Bensegueni A. (2009). Dermal wound healing effect of Pistacia lentiscus fruit's fatty oil. *Pharmacognosy Research* ,1(2):66-71.
- Belkhodja, Y. K. (2014).contribution à la description anatomique du phytomère chez le genre Pistacia de la wilaya de Tlemcen. mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de master cologie, gestion, et conservation de la biodiversite, université Abou berk belkaid-Tlemcen, p.35.
- Blache, D., Rustan, J., Durand, P.(1997). Gas chromatographic analysis of resvératrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations , *Journal Chromatography Biomedical Science Application*, , 702: 103-110.
- Bleux,J.(2014).Principles of Cultivar development.*Theory and technique* ,1:53.
- Benabdallah, F.Z. (2011) .*Etude morphologique des feuilles et des fruits du pistachier de l'atlas (Pistacia atlanticaDesf. ) et valorisation des huiles essentielles des feuilles et de l'oléorésine*. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en Biologie, Option Biotechnologie, Université Mohamed kheider Biskra, 56.
- Bammou ,H.,Ait said S ., Derridj ,A., Ganquelin , T., Mery J.P.(2014). Inter population variability if terpenoid composition leaves of Pistacia lentiscus L. from Algeria Achemoecologicalapproach.*Molecules*,16: 266- 257.
- Bennetau-Pelissero,C. (2014).Polyphenols and cellular pathways, *Recent data.Food Nutrition Research*,15(2):1-6;

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bruneton,J.(1999). Pharmacognosie, photochimie des plantes médicinales, 3eme édition, Tec et Doc (ED) Paris, 658-666.

Boukeloua,A.(2009). *Caractérisation botanique et chimique et évaluation pharmacotoxicologique d'une préparation topique à base d'huile de Pistacia lentiscus. (Anacardiaceae)*. Présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister en biologie, spécialité: biotechnologie végétale, université mentouri – constantine, p.1-67.

Boullard, B.(2001). Dictionnaire des plantes médicinales du monde: Réalités et Croyance, Ed: Estem, p414, 415.

Cabane.S. (2013), *Houttuynia cordata* Thunberg Saururaceae. Pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Ecole doctorale 306, Montpellier, p.258.

Charef, M.(2010). *Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimique et nutritionnelles des lipides des fruits de Pistacia lentiscus et du Quercus*, Thèse pour obtenir le grade de docteur, Option chimie organique appliquée, Faculté des Sciences et de l'Ingénieur Département de Physique, p.3-85.

Chiang, H.S., Julio,Y.,and Lu,F.J.(1994) .Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryon .*Journal of enzyme inhibition* ,8(1):61-71.

Chira,K., Teisseédre,P.L.,Saucier ,C., Suh,J.H.(2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75–82.

Chung, M.I., Teng, C.M., Cheng, K.L.(1992). An antiplatelet principle of *veratrum formosum*, *Planta Medicinal*, 58: 274-278.

Cohen,H ., Decordier I., Lombaert , N.(2001). changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *In Biochimie*, 126:621-628.

De Gaff ,H and Col,F(2002).Summarizing their reactions, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*, 29:10.

Delmas, D., Jannin, B., Valot, B.(2001). Aproches dans l'étude de la bioabsorption du resveratrol, un polyphénol du vin: interactions avec les protéine et captation par les cellules .*le Congrès Mondial de la Vigne et du Vin* ,56:269-311.

Dutta,S Li G, JohnsonD, Dzantiev,L Charles C. Richardson, Louis J. Romano, and Tom Ellenberger (2004). Crystal structures of 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene in complex with T7 DNA polymerase reveal mechanisms of mutagenesis.101 (46): 16186 – 16191.

Ehrenberg, L. (1960). chemical mutagenesis: Biochemical and chemical point of view on mechanisms of action, *chemische Mutagenes*, , pp 124- 136.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Eslava, O.M. (2004). Genotoxicity tests: Usefulness in occupational health Difficulties encountered in their application to the workers medical survey. *Archives of Public Health*, 62. 71-81.
- Franke, I.S., Pra, D., Silvab, J.D., Erdtmann, B., Henriques, J.A. (2005). Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research* 583: 75–84.
- Friedmann, J.P., Rafael, G., Barcelos, M., Serpeloni, J.M., Junior, F.B., Nersesyan A And Mantovani MS. (2010). Evaluation of the genotoxic and anti-genotoxic activities of Silybin in human hepatoma cells (HepG2), *Mutagenesis*, 25 (3) :223–229.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:81–9.
- Godet, H. (1993). Performances des tests d'Ames et micronoyaux triton, appliques a l'étude de la génotoxicité d'effluents complexes et des interactions entre polluants. Thèses pour obtenir le grade de doctorat a l'Université de Metz, Mention "Toxicologie de l'Environnement, l'Université de Metz. p.1-60.
- Goff, R., Walburger, D.K., Fairbairn J. (2006). Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells Discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 20:407–455.
- Hanna, K. (2005), Chromosome breakage at high dose rates, *Mutation Research*, 182:270 - 271.
- Harborne, J.B. (1990). Constraints on the evolution of biochemical pathway. *Biology Journal of Linnean Societ*, 39:135-151.
- Harfe, B.D., Minesinger, B.K., Jinks-Robertson S and. (2000). Discrete in vivo roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal of frameshift intermediates in budding yeast. *Current Biology*. 10:145-148..
- Hostettmann, M. (2014). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal Phytol*, (12): 10-4.
- Houk, U.S. (1992). The genotoxicity of industrial waters and effluents. *Mutation Research*, 277: 91-138.
- Iauk L., Ragusa S., Rapisarda A., Franco S., Nicolosi V.M. (1996) .In vitro Antimicrobial Activity of Pistacia lentiscus L. Extracts: Preliminary Report, *Chemother*; 8(3):207-9.
- Ibern-Gómez, M., Roig-Pérez, S., Lamuela-Raventós, R.M. (2000) . Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters, *J Agric Food Chemistry*, 48: 6352-6354.
- Iengar, V. (2012) characterization of complex chromosomal rearrangement. *Mutation Research*. 92: 3 – 7.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Irena, K.(2005). Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. *Curr. Medical Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5:29-46.

Jain, P.K and Joshi,H.(2010). Coumarins: Chemical and Pharmacological , *Faculty of pharmacy*, 02 (06): 236-24.

John M. J .,Kathleen B.(2001). 2-Aminopurine fluorescence quenching and life times: Role of base stacking. *Department of Biochemistry and Molecular Biophysics*, 98 (1):37– 41.

Khan, K. Ansari,L and Honey A.(2012). Induction of mutations in *Cichorium intybus* L. by base analogue 6-aminopurine (6-AP) and their detection with random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(56): 11901-11906.

Krief,S .(2003). *Métabolites secondaires des plantes Et comportement animal :Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de Chimpanzés (pan troglodytes schweinfurthii) en ouganda*. Thèse pour obtenir le grade de docteur du muséum national d'histoire naturelle discipline : écologie et chimie des substances naturelles, Muséum national d'histoire naturelle,pp..1-313.J

Lamblin,O.,Marquardt, R.R.,Frohlich, A., Lipid peroxidation as one mode of action in ochratoxin A toxicity in rats and chicks. *Drug Metabolism Reviews*, 77, 287-292.

Lenglet,G. (2010).*Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines*. Thèse présentée pour l'obtention du grade de :docteur , Biologie moléculaire et cellulaire, Université de Lille Nord de franc eecole Doctorale Biologie-Santé,pp .18-173.

Leist, A.D. Ayrtton and C. Ioannides. A .(1992) .cytosolic oxygenase activity involved in the bioactivation of 2-aminofluorene,*Toxicology*,71(1):7-20.

Maameri.(2014). *Pistacia lentiscus L.:Evaluation pharmacotoxicologique*. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences, Option pharmacologie Toxicologie, Université constantine 1, p.4-90.

Maron,D.,Ames,B.N.,Katzenellenboge,J. .(1981).Compatibility of organic solvent with the Salmonella /microsome test. *Mutation Research*, 88:343-350.

Maron,D and Ames,B.N.(1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test.*MutationResearch*, 113:173-215.

Marques,R.C.,Medeiros,S.B.,Silva.,Dias,C.,Barbosa-Filho,JM.,Agnéz Lima,L .F.(2003 )Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of thehydroalcoholic extract of *Ocotea ducke* by the Ames test, *Mutation Research*, 536:117–120.

Mitschell, A.D.,Blazek, W.F., Stewart, B.E., Galperin, I., Allen, K.L., Rudd, C.J., Caspary, W.J.(1996) .Chromosome analysis of trifluorothymidine-resistant L5178Y mouse lymphoma cellcolonies. *Environ. Mutagennic.*, 8, 229–240.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Morton, J.F. (1980). Search for carcinogenic principles. *Recent Advances in phytochemistry*, 14:53-73.

Muanda, F.N. (2010) *Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques*, Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur, Chimie organique, Ecole doctorale SESAMES, pp.5-239.

Myron, F., Randis. And Willis C.G. (1977). 2-Aminopurine-induced mutagenesis in T4 bacteriophage: A model relating mutation frequency to 2-aminopurine incorporation in DNA. *Biological Sciences*, 74(11): 4806-4810,

Neigi, P.S.; Jayaprakasha, G.K.; Jena, B.S. (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry* ., 80, 393–397.

Nkhili, E.Z. (2009). *Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant*. Diplôme de Doctorat. Sciences des Aliments, Ecole doctorale 306 – SPSA, MONTPELLIER, p.328.

Parker L.A. (1982) .Morehouse and e.E. Thomas Mutagenesis in Salmonella after NAOH-dependent microsomal activation of dimethylnitrosamine. *Mutation. Research.*, 105;29.

Perry, N ., Mejilla, F., Rahimtula, A.D. (2004). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Development*, 10:1433-1442.

Peter ,D., Moore ,T., samuel ,D., Rabkin, L., Osborn I., charles ,M. ,King ,S and Bernard, S. (1982). Effect of acetylated and deacetylated 2-aminofluorene adducts on in vitro DNA synthesis. *National Academic Science*, 79:7166-7170.

Picard, N. (2005). *Etudes in vitro et in vivo du métabolisme du mycophénolate et des interactions métaboliques entre médicaments immunosuppresseurs*. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges, discipline : pharmacologie, Ecole doctorale science-technologie-santé, 258, p.134.

Portes, E. (2008). Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydante, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat: Université de Bordeaux .

Rashed, K., Anthonissen, R., Cappoen, D., Verschaeve, L., Rashed, K. (2015). Photochemical Composition and Potential Genotoxic effects of Important Egyptian Medicinal Plants. *Pharmacognosy Communications*, 5:3.

Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.L., Richard, A., Azib ,L Richard, T., Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*. EUJIM-402:13.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Schade ,J. E, McGreevy K, King A D , Mackey B and Fuller G, 1975: Incidence of aflatoxin in California almonds. *Appl Microbiol* 29(1): 48-53.

Schatzki T F, (1995). Distribution of Aflatoxin in pistachios. 2. Distribution in freshly harvested pistachios. *J. Agricol Food and Chemistry*. 43, 1566-1569.

Schofield, M.J Hsieh, P. (2003).DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Reversion Microbiol*, 57:579-608.

Seigue A., (1985).La Forêt Circumméditerranéenne et ses Problèmes, Maisonneuve & Larose, pp 22- 27, pp 137 – 139.

Sugimura, T. (2000) .arcinogenesis .*Mutation Research*, 21:387-395.

Tsao.G.(2010).Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphénols. *Guelph Food Research Centre*, 2: 1231-1246.

Tulzani,K,Dudai.,N.etGolan-Goldhirs,A.(2011).Comparaison of Mediterranean Pistacia lentiscus Genotype by Random Amplified Polymorphic DNA,*Mutation Research*,23:8.

Witkin, E. M. (1974). Thermal enhancement of enhancement of repair and mutagenesis: depend- ultraviolet mutability in a tif-1 uvrA derivative of ence on chromosomal genes in Escherichia coli B/r : evidence that ultraviolet K-12. *Molecular and General Genetics*, 152:93-103.

Wright,A.V and Bridges,B.A.(1980).Effect of tif Expression, Irradiation of Recipient and Presence of Plasmid pKM101 on Recovery of a Marker from a Donor Exposed to Ultraviolet Light Prior to Conjugation .*Journal of General Microbiology*,119: 327-331.

Young, R.(2002). Genetic toxicology: Web resources. *Toxicology*, 173:103– 121.

Zarrour. (2012). *Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de le plante Matricaria pubescens (Astér acéas) et évaluation de leur activité antioxydante*, Master Académique, Chimie Appliquée, Universite kasdi merbah ouargla, p.23.

Zahin M Aqil F Hussain FM Ahmed DI Antioxydant capacity an antimutagenic ottential of Murraya Koenigii, *Biomedical Research*,2013:1-10.