

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : biologie moléculaire et cellulaire

**Thème : Contribution à l'étude de l'effet toxique de
l'extrait aqueux de la *marjolaine* (*Origanum
majorana*) par le test *Allium Cepa* .**

Présenté par :

- Alale Bouthayna
- Belkhairi Nesrine
- Boukharouba Amira
- Zizoui Djouheina

Devant le jury composé de :

Président (e): Hamdiken M.	M.C.B	Université de Guelma
Examineur : Merabet R.	M.A.A	Université de Guelma
Encadreur : Ayed.H	M.C.B	Université de Guelma

Juin 2022

Sommaire

Liste des Abréviations

Liste des Tableaux

Liste de Figures

Introduction 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les plants médicinales

I.Plantes médicinales 4

I.1. Définition 4

I.2.Principes actifs des plantes médicinales 4

I.2.1. Eléments actifs des plantes 5

I.3.Modes de préparation des plantes pour la phytothérapie 6

I.3.1.Modes de préparation des PM 6

I.3.2.Voies d'administration des PM 7

I.4. Utilisations des plantes médicinales 7

I.5.Toxicité de la plante médicinale 7

I.5.1.Toxique 7

I.5.2. plantes toxiques 7

I.5.3. Causes de phytotoxicité 8

Chapitre II : Généralités sur *origanum majorana*

II.Etude botanique 10

II.1. Description botanique 10

II.1.2.Taxonomie 11

II.1. 3.Aire géographique du genre *Origanum* 12

II.4. Composition chimiques 13

II.5. Principes actifs d'*Origanum majorana* 13

II.6. Activité antioxydante 14

II.7. Activité antibactérienne 14

II.8. Activité antifongique 15

II.9. Activité antivirale 15

II.10. Activité anti-tumorale 15

II.11. Propriétés thérapeutiques d'*Origanum majorana* 15

Chapitre III : Génotoxicité

III.1.Définition	18
III.2.Cycle cellulaire	18
III.2.1. Phases du cycle cellulaire	19
III.2.1.1. Interphase.....	19
III.2.1.2.mitose	20
III.3.Activité génotoxique	23
III.4.Dommages à l'ADN causés par des substances mutagènes.....	23
III.4.1.Mutation génétique.....	23
III.4.2. Mutations chromosomiques.....	23
III.5. Agents mutagène.....	23
III.5.1.Azide de sodium	24
III.6.Tests de génotoxicité.....	24
III.6.1.Testes de mise en évidence d'un pouvoir mutagène au niveau génique	25
III.6.1.1.Le test des comètes.....	25
III.6.1.2.Test d'Ames.....	26
III.6.2.Tests cytogénétiques	28
III.6.2.1Tests Aberrations chromosomiques.....	28
III.6.2.2.Test des micronoyaux.....	28
III.6.2.3.Echange de chromatides sœurs (SCE).....	29
III.6.2.4.Test <i>Allium Cepa</i>	30

Partie II : Travail expérimental

Chapitre I : Matériel et Méthodes d'Analyse

I. Matériels et méthodes d'analyses	34
I.1.Matériels	34
I.1. 1. Matériel végétal.....	34
I.2.Méthodes d'analyse	34
I.2.1. Screening phytochimique	34
I.2.1.1.Flavonoïdes	34
I.2.1.2.Saponosides	35
I.2.1.3.Tanins.....	35
I.2.1.4.Mucilages	35
I.2.1.5.Coumarines	35

I.2.1.6. Glycosides	36
I. 3.Détermination de la cytotoxicité par le teste <i>Alliums cepa</i>	36
I. 3.1. Préparation d'extrait aqueux <i>d'origain mgorana</i>	36
I.3.2.Détermination de la quantité des polyphénols	36
I.3.3. Etude de l'activité cytotoxique de l'extrait.....	38
I.3.3.1.préparations des racines d'Allum cepa.....	38
I. 3.3.2.Evaluation de l'effet cytotoxique	38
I.3.3.Analyse macroscopique	39
I.3.4. Fixation de l'extrémité racinaire	39
I.4 Etude stastique.....	40

Chapitre II : Résultats et discussion

II. Résultats et discussion.....	42
II.1. Résultats du Screening phytochimique	42
II.2. Résultats Dosage des poly phénols totaux	43
II.3.Evaluation del' effet cytotoxique	44
Conclusion.....	49
Résumé	51
Annexe	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59

Remerciements

Louanges à **ALLAH** le clément, le tout puissant qui nous a procuré la patience, la force
et le courage d'aller au bout de notre objectif.

Nous tenons particulièrement et chaleureusement à remercier notre
promotrice Mme.**Ayed.H** Pour sa confiance, ses encouragements et conseils tout au long
de la réalisation de ce travail. Pour son soutien, patience, disponibilité, gentillesse et sa grande
générosité, qu'elle soit assurée de notre profonde gratitude. Ce travail n'aurait pas été le
même sans votre encadrement

présider le jury ;

Madame Merabet R, d'avoir acceptés d'examiner

Nos vifs remerciements vont à **Madame Hamdiken M**, pour avoir accepté d'examiner et de
modeste travail

On a eu le plaisir d'effectuer notre
recherche dans le Laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie,
de l'université **8Mai 1945 Guelma** .

Qu'elle trouve ici toute notre sympathie.

On remercie l'ensemble du personnel du laboratoire
pour leur convivialité, pour leur disponibilité.

Enfin, notre gratitude est adressée spécialement à
nos familles, amis (es) et toutes personnes ont pus
soutenir de près ou de loin la préparation de ce
modeste travail.

Merci

Dédicace

Je dédie ce travail *à mon père* **BOUKHAROUBA DJAMEL.**

A l'être la plus chère au monde, Qui m'a toujours encouragé, conseillé et soutenuet

à ma mère **MOUBIENE DALILA** qui m'a encouragé et illuminé

ma vie par ses conseils

A mes chers frères: **MOUSSA et YOUCEF.**

Et ma seule sœur : **ABIR.**

A mon mari: **ROUAIGUIA HAMZA.**

A ma tante : **MOUBIENE DJAMILA**

A mes amies et ma meilleur amie **BOUKHAROUBA BESMA.**

A.M.F.R.A

Dédicaces

A Mes Très chers Parents

Je dédie ce mémoire à mes parents, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études. Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être.

AMMANTRES CHERE MERE Zahra

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices.

AMONTRRES CHER PERE Rabah

De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

*A Ma Soeur Imen et Ses Filles Anfel et Soujoud Mon Frère Islem . Mes
Oncles , Mes Tantes et Mes cousines*

Je leur dédie ce travail pour tous les sacrifices qu'ils n'ont cessé de m'apporter tout au long de mes années d'études Que Dieu leur apporte le bonheur, les aide à réaliser tous leurs voeux et leur offre un avenir plein de succès.

A Mes Amis

Nulle dédicace ne pourrait exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude pour tous les encouragements et soutiens qu'ils ont consentis à mon égard.

Bouthaina

Liste Des Abréviations

NaN₃ :L'azoture de sodium

NH₄OH : Ammonium hydroxyde

MN: micronoyau

H₃PMo₁₂O₄₀ :d'acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ :d'acide phosphotungstique

NaN₂ :l'azide de sodium

FCR : réactif de Folon Ciocalteu

AC : Aberrations Chromosomiques

SCE : Echanges entre Chromatides Sœurs

His : Histidine

Liste Des Tableaux

Tableau 1: Classifications taxonomiques d' <i>Organum majorana</i>	11
Tableau 2: Eléments nutritionnels présents dans l' <i>O. Majorana</i>	14
Tableau 3: Criblage phytochimique d' <i>O. Majorana</i>	42
Tableau 4: Teneur en composés phénoliques d'extrait aqueux	43
Tableau 5: Résultats du test d'inhibition de la croissance des racines d' <i>Allium cepa</i> après 72	46

Liste Des Figures

Figure 1: Partie aériennes d' <i>Organum majorana</i> L	10
Figure 2: Aire de distribution du genre <i>organum</i>	12
Figure 3: Différentes phase du cycle cellulaire	18
Figure 4: Représentation schématique d'une cellule en prophase.	20
Figure 5: Représentation schématique d'une cellule en métaphase.	21
Figure 6: Représentation schématique d'une cellule en anaphase.	22
Figure 7: Représentation schématique d'une cellule en télophase.	22
Figure 8: Observations des noyaux par les testes des comètes.	26
Figure 9: Protocole des différentes étapes de la préparation de l'extrait aqueux.....	37
Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	44

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisée diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies (**Lee, 2004**).

Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**World Health Organisation, 2000**) Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance dans le commerce international (**Cordell et Colvard, 2005**).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

Origanum majorana. est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle en Algérie en particulier, dans la région du soufe la plante est utilisée pour des différent raisons, à savoir son utilisation contre l'infertilité féminine, et pour se soigné contre les maladies digestives et respiratoire ainsi que les brulures et les maux de tête.

Malgré l'importance de cette plante peu d'étude ont été faite pour caractériser cette espèce et cette substance bioactives. Tandis qu'aucune étude n'a été faite pour étudier l'effet inducteur de cette plante ou l'effet toxique. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude..

L'objectif de la présente est d'étudier l'effet de l'extrait aqueux préparé à partir de cette plante sur le devloppement des racines de l'orignon par le test *Allim cepa*.

Allium cepa, l'oignon, fait partie de la famille des alliées. Cette plante est cultivée dans de très nombreux pays pour son usage alimentaire. Le caryotype présente cinq paires de chromosomes (de 8 à 16 μm) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites (**Grant, 1982a**).Le test *allium cepa* permet l'évaluation de divers critères de toxicité et de génotoxicité.

Afin de mieux comprendre comment les utiliser la marjolaine en phytothérapie.

Ce manuscrit est constitué de deux parties ; la première est une étude bibliographique qui comporte trois chapitres :

- ❖ Le premier est consacré aux plantes médicinales.
- ❖ Le deuxième chapitre est focalisé sur la plante étudiée *Origanum majorana*.
- ❖ Troisième chapitre traite la cytotoxicité.

Pour la deuxième partie expérimentale

- ❖ Le premier présente les matériels et les méthodes adoptées dans l'étude .
- ❖ Le deuxième illustre les résultats obtenus et leurs discussions

Partie I :
Synthèse bibliographie

Chapitre I :
Généralités Sur Les Plantes
Médicinales

I. Plantes médicinales

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales constituent une source majeure pour le traitement de nombreuses maladies humaines à travers le monde. Ainsi, la demande de remèdes issus de sources naturelles pour remplacer les médicaments thérapeutiques synthétiques et minimiser leur effet secondaire et leur toxicité, n'a pas cessé d'augmenter. **Selon Vuorelaa et al.** Au cours des 20 dernières années, Plus de 25 % des médicaments sont directement isolés des plantes, et les 75 % restant sont obtenus à partir de leurs produits dérivés chimiquement.

I.1. Définition

Plante médicinale : sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Sanago R, 2006**) car elle répond à la définition du médicament : « est considérée comme médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques » (**Sofowora A. 2010**).

Les plantes sont organismes vivants marqués leur identités par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant leur intérêt de leur l'usage des plantes médicinales (**Brunetonq J, Barton DHR. 1987**).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Sofowora A., 2010**).

I.2. Principes actifs des plantes médicinales

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante; On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Donc, les plantes médicinales doivent leurs actions à un ou plusieurs principes actifs que l'on peut analyser chimiquement et qu'il est indispensable de connaître pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme. Les plantes contiennent des métabolites primaires et secondaires. Les métabolites secondaires sont des substances indirectement essentielles à la vie des plantes, ils participent à l'adaptation de la plante à son environnement, ainsi qu'à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variations de la température ...).

Tandis que les métabolites primaires jouent un rôle principal dans le développement et la croissance de la plante lui confèrent son activité thérapeutique (**SEBAI M, BOUDALI M. 2012**). Les composés sont des composés phénoliques, des terpènes, des stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes.

I.2.1. Eléments actifs des plantes

- **Alcaloïdes**

Renferment un groupe chimiquement très divers des composés chimiques contenant des substances organiques azotées basiques, souvent se sont extrêmement toxiques, (**Verdegrer, 1978**).

- **Tanins**

Sont des extraits poly phénoliques des plantes, utilisé pour tanner les peaux, sont connues par leurs propriétés antiseptiques, antibiotique, astringente, Anti diarrhéique (**Schauenberger Paris, 1977**).

- **principes Amers**

Sont des substances naturelles végétale susceptible de libérer de l'azote, très diverse, ayant une saveur amer, et une action stimulante sur la production de suc gastrique, favorisant la digestion, sont connu par leur propriétés de traitement des maladies hépatiques, rénale et l'anémiecet(**Khetouta, 1987**).

- **glucosides**

Se composent en deux parties : un composant glucidique (Glycone) et un composant non glucidique (aglycone) peuvent être glucosides cardioïdes, les glucosides phénoliques, les glucosides sudorifiques ne peuvent agir sélectivement dans le corps humain, sur un ou plusieurs organes dans le but de stocker les réserves nutritives d'après leurs compositions groupe : les glucosides sulfurés, (**Khetouta, 1987**).

- **huiles essentielles**

La norme AFNOR NE 75-006 définit l'huile essentielle Comme « Un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par Entrainement à la vapeur d'eau, soit par hydro distillation, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (AFN, 1986).

- **Mucilage**

Est une substance végétale qui se compose de sucre et de polysaccharide, et considère comme une gamme visqueuse se gonflant dans l'eau, a une action protectrice contre les attaques acides et les irritations.

- **Vitamines**

Sont des principes alimentaires essentiels, pour l'homme et l'animal, réalisent des fonctions métaboliques .ces substances de nature chimique (A, C, E, K, groupe B)(Schauenberget Paris, 1977).

- **Saponines**

Le terme saponine est dérivé de mot savon, sont des terpènes glucidique, et ils peuvent se trouver aussi sous forme aglycone, ils ont un goût amer et acre (Hospikins, 2003).

- **Antiseptique végétaux**

Sont des substances antibiotiques produites parlesplantes (Grunwald etJanicke, 2006).

I.3.Modes de préparation des plantes pour la phytothérapie

I.3.1.Modes de préparation des PM

Le mode de préparation d'un produit phytothérapeutique peut avoir un effet sur la quantité du principe actif présent. Le moment et la saison de la récolte de la plante, ainsi que le type de sol où elle pousse, peuvent également influencer son efficacité. Pour produire une préparation, on commence généralement par moudre les parties de la plante qui ont des propriétés médicinales. La matière végétale ainsi moulue est appelée macérat. Selon le type de plante et le procédé employé, le macérat peut être séché avant d'être moulu. On trempe ensuite le macérat dans un liquide pour en extraire les principes actifs. Ce liquide est appelé

solvant, et il existe plusieurs méthodes pour effectuer cette opération: infusions, décoctions, teintures, extraits, cataplasmes (**Taylor L. 2005**).

I.3.2. Voies d'administration des PM

Les modes de préparation existent plusieurs voies d'utilisation:

- **voie orale** c'est la voie la plus utilisée.
- **Lotion** à application sur la peau ou les organes atteints.
- **Inhalation** des vapeurs chaudes émanant du liquide de préparation.
- **Bain ou lavement** (**Taylor L. 2005**).

I.4. Utilisations des plantes médicinales

Pendant longtemps, les plantes n'ont été utilisées dans la nature que sous forme de tisanes ou de poudres. Beaucoup se présentent maintenant sous forme de capsules, mais les plantes médicinales sont utilisées sous de nombreuses formes. Pour ces préparations, des règles de bonnes pratiques pharmaceutiques ont été établies de nombreux paramètres doivent être respectés, comme le nombre de plantes, les associations possibles, les saveurs, et même le goût du client doit être adapté.

Il convient également de noter que de nombreuses plantes ne sont utilisées qu'en homéopathie. C'est le cas par exemple de la souche d'arum à trois feuilles appartenant à la famille des Araceae ou de la souche d'arum à trois feuilles du radis indien. Il est utilisé en dilution pour traiter les affections respiratoires et les tensions vocales (**Beauquesne, 1986**).

I.5. Toxicité de la plante médicinale

I.5.1. Toxique

Une toxine (du grec toxikon = poison) est une substance hétérogène à l'organisme. Elle interfère avec une relation dose-dépendante. Image clinique Produits par les poisons sont des "syndromes toxiques" ; ce sont des syndromes d'origine toxique, évocateurs d'effets toxiques cinétiques (**Généstal, 2009**).

I.5.2. Plantes toxiques

Plantes toxiques lorsqu'une plante contient une ou plusieurs substances, elle est considérée comme toxique. Nocif pour les humains ou les animaux et l'utilisation cause des problèmes. Plus ou moins grave et même mortelle (**Fournier, 2001**).

La définition doit tenir compte des annotations suivantes :

- Où les plantes sont plantées et quand elles sont cueillies, ce qui les affecte la concentration du principe actif et donc sa toxicité
- L'ingrédient actif d'une plante vénéneuse peut être distribué dans toute la plante ou Priorité dans une ou plusieurs de ses parties : racines, baies ou Feuilles.

La notion de dose est déterminante ; certaines plantes utilisées à des fins thérapeutiques Peuvent constituer une menace pour la santé humaine à fortes doses. Ceci est fait par exemple la sauge, la sauge, l'armoise blanche, l'absinthe blanche et Absinthe Artémisionarborescents, toutes trois sont des plantes médicinales mais très toxique (**Royaume, 2016**).

I.5.3. Causes de phytotoxicité

La toxicité des plantes médicinales peut être expliquée comme suit :

- **Toxicité inhérente aux ingrédients** les plantes médicinales sont des mélanges Un complexe de diverses molécules. Leur composition, souvent mal définie, consiste en Molécules aux activités biologiques notoires, entre autres, les hétéros glycosides, Alcaloïdes, anthocyanes, tanins et stéroïdes. Comme toutes les molécules Biologiquement actifs, ces ingrédients peuvent être présents à certains niveaux de concentration toxicité (**Zekkour, 2008**).
- **Intrinsèque** : La composition des produits végétaux varie considérablement D'ailleurs, le contenu de ces ingrédients variera naturellement d'une formulation à l'autre. Autre.
- **Identification imprécise des ingrédients** : les préparations à base de plantes peuventPeut avoir des effets indésirables lorsque l'un des ingrédients devient toxique Substances gravement toxiques, non identifiées ou mal identifiées : 1991 et 1992, substitut AristolochefangchiStéphanatétrahédre dans les préparations amincissantes est Causes d'insuffisance rénale sévère chez les consommateurs.
- **Altéré** la toxicité peut également être liée à la présence d'ingrédients altérés Préparations chimiques à base de plantes, qu'elles soient à base de plantes ou produits chimiques médicinaux (**Zekkour, 2008**).
- **Contamination** : Les produits à base de plantes médicinales peuvent contenir Les polluants toxiques tels que les pesticides et les métaux lourds et le pollen, Champignons et moisissures microscopiques pouvant provoquer des réactions Allergique et/ou toxique.(**Zekkour, 2008**).

Chapitre II :
Généralités sur *origanum majorana*

II. Etude botanique

Origanum est dérivé de 'Oros' qui signifie montagne et 'ganos' qui signifie briller ; ce mot signifierait « ornement des montagnes ». L'apparition du terme français était au 13^{ème} siècle, européen (*Origanum* sp.) et mexicain (*Lippia* sp.) « Origan ». Le nom Origan est couramment utilisé dans le monde entier pour signifier un arôme et une saveur épicés (Balahbib et al ; 2021).

Origanum Majorana (connue sous le nom de Sahtar ou Zaatar en médecine traditionnelle) actuellement nommée marjolaine douce est une plante médicinale de la famille des Lamiacées, une plante herbacée vivace du genre *Origanum*. Au port autoportant. C'est une photoautotrophe. Cette plante est répartie autour des régions méditerranéennes notamment au Maroc, en Algérie, en Égypte, en Espagne et au Portugal (Bouyahaa, 2020).

II.1. Description botanique

O. majorana forme des touffes de 20 à 40 cm de haut, assez ramifiées, aux feuilles ovales, petites, tendres et velues. Ses fleurs minuscules, blanches ou rosées sont groupées en corymbes, son parfum est si puissant qu'il suffit de passer la main sur une touffe pour qu'une agréable odeur se répande alentour (Bia S, 2019). Les fleurs de cette plante sont hermaphrodites dans la nature ayant les deux sexes sur la même plante. Les graines sont minuscules, ovales, foncées et brunes qui mûrissent d'août à septembre.

L'organum majorana a des racines pivotantes. Elles ont un diamètre de 0,2 mm à 0,6 mm. Les racines de la plante sont de forme sub-cylindrique et plissées longitudinalement avec des fissures transversales. Elle a une odeur aromatique et un goût non persistant. Les fractures sont longues, irrégulières et fibreuses (Muqaddas, 2016).



Figure 1: Partie aériennes d'*Origanum majorana* L. (Prerna et vasudeva, 2015).

II.1.2.Taxonomie

Le genre *Origanum* appartient à la famille des Lamiaceae et à la sous famille des Nepetoideae .le point de vue taxonomique a été complètement revu par Dr JHLetswaart en 1980(Balahbib et al ; 2021).

Tableau 1: classifications taxonomiquesd'*Origanum majorana*.

<u>Règne</u>	<u>Plantes</u>
Sous-règne :	Chlorobiontes
Infra-règne:	Streptophytes
Super-division :	Embryophytes
Division:	Trachéophytes
Sous-division:	Spermatophytines
Classe:	Dicotylédones
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Lamiales
Famille:	Lamiacées
Sous-famille :	Népétoïdées
Tribu :	Mentheae
Genre :	<i>Origanum L.</i>
Espèce :	<i>Organummajorana L. (Tripathy et al., 2017)</i>

II.1. 3.Aire géographique du genre *Organum*

Dans le monde

Les membres du genre *organum* définis par Ietswaart sont distribués principalement dans la région méditerranéenne, avec plus de 81 pourcent situés exclusivement dans la région est méditerranéenne. Même si la distribution la plus importante, des cultures peuvent être retrouvées à Cuba, ou encore à la Réunion (**Bia, 2019**).



Figure 2:Aire de distribution du genre *organum* (ZENSANI L, 2014).

En Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. *L'Organum* de la famille des Lamiacées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jus qu'aux

zones arides. Il est représenté en algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement. Elle est représentée par trois espèces spontanées phylogénétiquement :

- *Origanum majorana* et *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* Desf. en Algérie et Tunisie.
- *Origanum floribundum* en Algérie (Bia, 2019).

II.4. Composition chimiques

O. Majorana est aussi riche en composants (80) dans l'extrait de son huile essentielle et qui sont en majorité des mono terpènes. La marjolaine est cultivée pour ses feuilles aromatiques, les cimes sont coupées lorsque la plante commence à fleurir et sont séchées lentement à l'ombre. Elle est souvent utilisée dans les combinaisons d'herbes telles que les herbes de Provence et zaatar. Les principaux constituants dans **tableau 02**.

II.5. Principes actifs d'*Origanum majorana*

Comme de nombreuses plantes aromatiques ou fines herbes, la *marjolaine* apporterait à l'organisme une quantité non négligeable d'antioxydants, bénéfiques pour préserver le corps des méfaits de certains radicaux libres. Elle contiendrait en effet des composés phénoliques (acides phénols), notamment de l'acide rosmarinique, des flavonoïdes, de l'épigénine, de la lutéoline et de l'acide carnosique) (CHIKHOUNE., 2007).

La marjolaine contiendrait également un certain nombre de vitamines, parmi les quelles la vitamine K, nécessaire à la fabrication des protéines, à la coagulation sanguine et à la formation des os ; du fer, indispensable au transport de l'oxygène dans le sang et à la formation des globules rouges ; du calcium, qui contribue à la formation et à la solidité des os, au maintien de la pression sanguine et la contraction des muscles. En outre, la marjolaine serait une source non négligeable de manganèse, participant à différents processus métaboliques et à la protection contre les radicaux libres. Enfin, la marjolaine renfermerait de la vitamine E, contribuant ainsi à protéger la membrane entourant les cellules (SCHAAL., 2010).

La marjolaine contient également une huile essentielle, composée, entre autres, de camphre, d'esters, de bornéol, de sabinène et de terpène. Elle participerait à combattre certaines bactéries, à apaiser le système nerveux, à dilater les artères, à augmenter leur tonus et à vaincre certaines formes de spasmes (SCHAAL., 2010).

Tableau 2: Eléments nutritionnels présents dans *O. Majorana* (Tripathy et al, 2017).

<u>Les denrées alimentaires et les microéléments</u>	<u>Les valeurs nutritionnelles pour majorana</u>
Energie	271cal
Glucides	60,56g
matières grasses totales	7,04g
Cholesterol	0mg
Fibresalimentaires	40.3g
vitamines	
acidepantothénique	0,209mg
vitamine A	8058UI
vitamine K	621.7µg
vitamineC	51.4mg
vitamine E	1,69mg
Les Électrolytes	
Sodium	77 mg
potassium;	1522 mg
Les Minéraux	
Calcium	1990 mg
Fer	82,71 mg
Zinc	3,60 mg
Les Phytonutriments	
carotène-β	4806 µg
cryptoxanthine-β	1895 µg.

II.6. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la

Conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les poly phénols qui sont responsables de ce pouvoir (LAIB., 2011).

II.7. Activité antibactérienne

L'action des HEs sur la prolifération microbienne se fait a travers l'altération de la Perméabilité membranaires des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique ; le

transport des électrons et la production de l'énergie. Le mode d'actions d'HE dépend du type de microorganisme (SAIMI. 2014). En général bactérie GRAM- sont plus résistantes que les GRAM + grâce à la structure de leur membrane interne (OUIS. 2015).

II.8. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des HEs des plantes aromatiques contre les moisissures Allergisantes et contre les champignons pathogènes et opportunistes tel que *Candida albicans* (SAIMI. 2014).

II.9. Activité antivirale

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HEs tel que les monoterpénols et les monoterpénals (SAIMI. 2014). De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des HEs (ZENASNI. 2014).

II.10. Activité anti-tumorale

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle de *Nigella arvensis* démontre une activité cytotoxique contre différents lignées tumorales (TOURE., 2015). Ainsi que l'huile essentielle de *Myrica gale* exerce un effet inhibiteur sur la croissance des cellules cancéreuses des poumons, et du colon. (LEMAOUI., 2011).

II.11. Propriétés thérapeutiques d'*Organum majorana*

La marjolaine serait réputée pour ses vertus calmantes, notamment en situation d'excitabilité psychique et d'excitation nerveuse. Elle participerait à réduire les effets du stress. Au niveau de la sphère digestive, la plante interviendrait pour stimuler l'appétit et réguler certains troubles digestifs. Par ailleurs, la marjolaine posséderait des propriétés anaphrodisiaques (AGRIMER. 2012).

Ses propriétés médicinales

- ❖ Calme les douleurs musculaires, articulaires, crampes, courbatures, et les règles douloureuses.
- ❖ Un tranquillisant du système nerveux.
- ❖ Nervosité, dépression, anxiété, insomnies et aux migraines.

- ❖ Troubles digestifs, spasmes intestinaux, flatulences, ballonnements, diarrhées, nausées et stimule l'appétit.
- ❖ Régule la tension artérielle.
- ❖ Nettoie les voies respiratoires (En inhalation).

- ❖ Un antiseptique efficace contre les aphtes, maux dentaires, la gingivite et autres infections touchant la bouche.

- ❖ Apaise les foulures et les douleurs articulaires.
- ❖ Soigne les plaies superficielles.
- ❖ Problèmes respiratoires.
- ❖ Calme les accès de toux.
- ❖ En cas d'asthénie.

Chapitre III :

Génotoxicité

III.1.Définition

La génotoxicité est la matière nucléaire, qu'elle provoque ou non de la mutation (Umbuzeiro et al., 2016) génotoxicité est une caractéristique nécessaire des substances toxiques généralement causée par mutation, phénomènes génétiques ou ruptures de brins d'ADN (Akhtar et al., 2016). Toxicologie La génétique ou la génotoxicité est la toxicité d'une substance à l'acide désoxyribonucléique (ADN), provoquant directement des lésions ou des mutations Ces mutations peuvent survenir Indirectement après l'activation métabolique des enzymes hépatiques. Système La réparation cellulaire est responsable de l'élimination de ces lésions. Cependant, un correctif l'imperfection peut également entraîner des mutations génétiques, qui peuvent conduire au cancer (Fernandez et al. 2013).

III.2. Cycle cellulaire

Les cellules vivantes se dupliquent elles-mêmes après un cycle cellulaire. La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles identiques à la cellule dont elles dérivent.. Le cycle cellulaire est essentiellement constitué de deux temps, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles (Meijer, 2003; Potapova et Gorbsky, 2017).

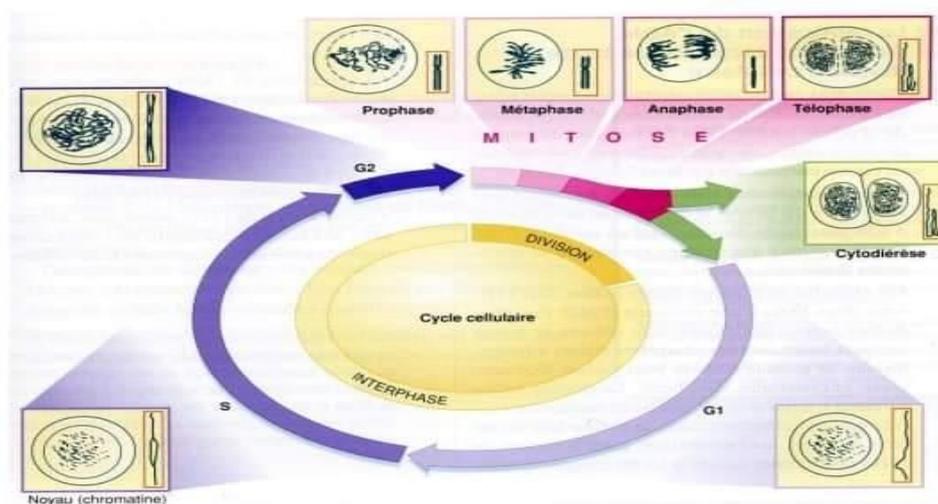


Figure 3: Différentes phases du cycle cellulaire (<http://www.lycee-sainte-cecile.com>).

III.2.1. Phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des eucaryotes comporte quatre phases. De ces deux étapes, l'étape Pendant les phases S et M, les cellules subissent deux événements fondamentaux dans le cycle: la réplication Partage strictement égal des chromosomes entre l'ADN (phase S, pour la synthèse) et 2 Cellules filles (phase M, mitose). Les deux autres phases du cycle G1 et G2 représentent Gap : en phase G1, les cellules se développent, intègrent des signaux Mitogène ou anti-mitogène et prêt à effectuer correctement la phase S ; pendant cette période en phase G2, les cellules se préparent pour la phase M (Otto et Sicinski, 2017).

III.2.1.1. Interphase

La mésosphère est divisée en trois phases: G1, S et G2. L'étape G1 est où les cellules sont amorcées pour la synthèse d'ADN (Diffley, 2004; Johnson et Skotheim, 2013).

- **Phase G1**

La première étape de croissance (croissance); les cellules passent par une étape de croissance ont leurs dimensions définitives. Au cours de cette phase, ils travailleront et exécuteront également divers Ils sont programmés pour fonctionner (Klug, 2006). Environ 90% Durée de la période (Nabors,2009).

- **Phase S**

Correspond à l'étape de la synthèse de l'ADN, où une copie exacte du matériel génétique générer des cellules. La réplication est lancée sur de nombreuses sources pour les raisons suivantes recrute des ADN polymérases (Hanaoka et Sugazawa, 2016 ; Li et al. 2007).

- **phaseG2**

C'est la deuxième étape de la croissance et c'est l'étape avant d'entrer en mitose. Milieu

Les cellules à ce stade maximisent leur volume en vue de nouvelles divisions (Klug, 2006).

III.2.1.2.mitose

La mitose est la capacité d'obtenir deux de la cellule parental les mêmes cellules filles. cette phase ne représente que 10% de la durée du cycle cellulaire.il comprend deux processus : la division du noyau et la division du cytoplasme.conduit à la distribution de nouveaux noyaux dans les deux cellules filles (**Nabors, 2009**).

- **prophase**

Il s'agit d'une phase d'une durée de 15 à 60 minutes (**Petit et Julien, 2007**).Début précoce

Caractérisé par l'individualisation des chromosomes, suivie d'un épaississement et raccourcie; chaque chromosome est composé de deux achromatisez sœurs Centromère. Deux centromères accompagnés de microtubules constituent les asters migre vers les deux pôles opposés de la cellule (**Kalitsis et al. 2017**).

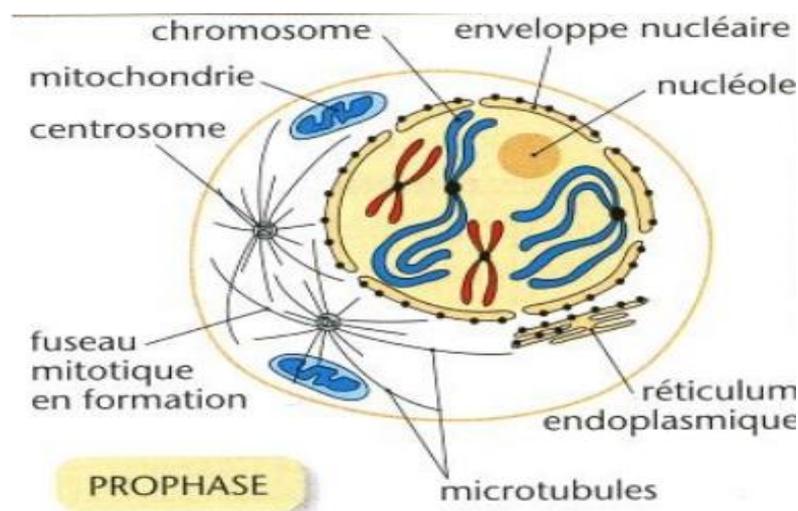


Figure 4:Représentation schématique d'une cellule en prophase.

- **prométaphas**

En pro métaphase, les microtubules s'assemblent pour former des fuseaux bipolaires

SES deux pôles s'organisent autour de chaque centrosome, se repentant en phase S.

Passage entre les microtubules du fuseau et les chromosomes des structures protéiques appelées centromères qui se lient au centromère (**Prosser et al. Pelletier, 2017**).

▪ Métaphase

Centromère sur la plaque équatoriale. Le centromère se fixe aux microtubules polaires

Cellule. à ce Le mi-parcours ne dure que quelques minutes. Elle se caractérise par le regroupement stade, tous les chromosomes peuvent être clairement observe vue polaire (Meijer, 2003).

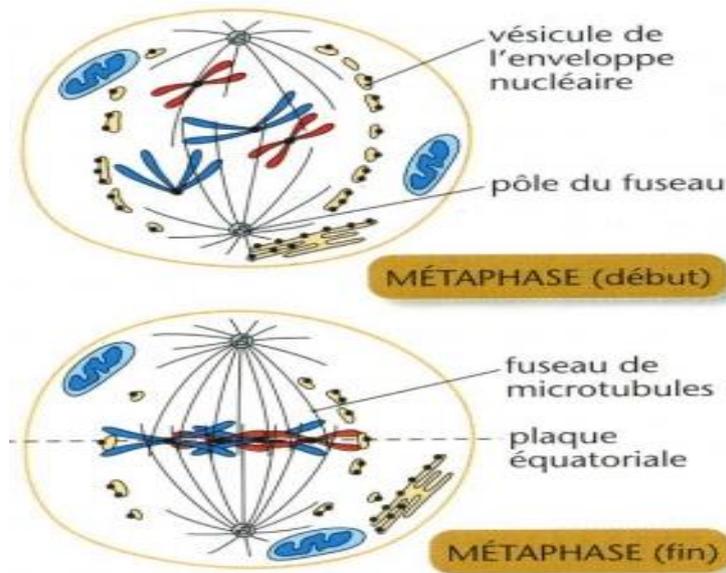


Figure 5: Représentation schématique d'une cellule en métaphase.

▪ Anaphase

C'est une phase très courte (2 à 3 minutes). Chaque centromère est divisé en deux. Fibre

Claque ensemble de chromatides est ensuite amené vers les pôles cellulaires. cette separationpermedeux ensembles de chromosomes monochromatiques identiques ont été obtenus (Nabors, 2009).

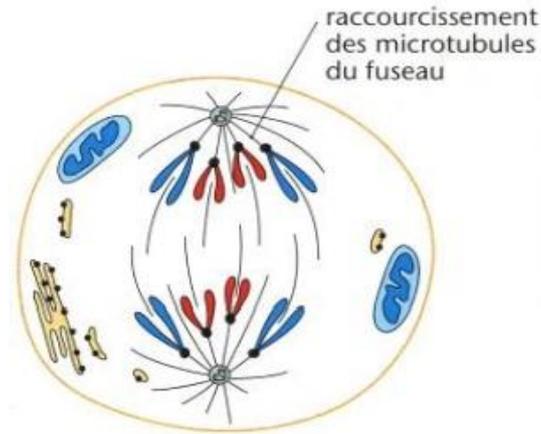


Figure 6: Représentation schématique d'une cellule en anaphase.

▪ Télaphase

Elle dure de 15 à 60 minutes (**Elord et Stansfield, 2003**). Les chromosomes ont atteint

le plateau de broche. Une structure microtubulaire formée au milieu des deux lots de chromosomes. La contraction marque le site de la cytokinèse (**Meijer, 2003**). Inversement, la prophase et la télaphase sont les étapes de la réorganisation de la membrane nucléaire. Les chromosomes sont décondensés et les fuseaux incolores disparaissent (**Petit et Julien, 2007**). Cette division est l'événement le plus important dans lequel le cytoplasme se divise en deux parties, deux cellules filles génétiquement identiques se forment (**Delattre, 2006; Suryadinata et al., 2010**).

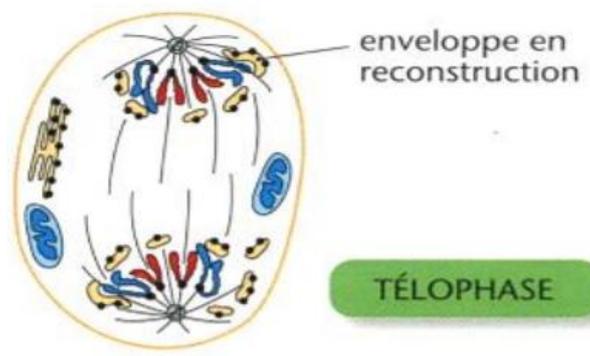


Figure 7: Représentation schématique d'une cellule en télaphase.

III.3. Activité génotoxique

Les études de génotoxicité et de mutagenèse chez les espèces à potentiel médicinal préventive conduire Induit des changements génétiques et cause certains problèmes de santé (**Chiavegatto et al. 2017**). Les agents génotoxiques sont capable d'agir directement ou Agît sur l'ADN indirectement, en cassant un ou les deux brins d'ADN, en modifiant les bases (supprimer substitution, décalage) (**Raffine, 2009**).

III.4. Dommages à l'ADN causés par des substances mutagènes

Les gènotoxine sont des molécules qui ont un effet toxique sur le génome, En particulier, la capacité de modifier le matériel génétique. Ces changements peuvent être directement modifications qui induisent l'ADN (mutations génétiques) ou les chromosomes (mutations chromosome), ou indirectement, comme la structure des nucléotides modifiés qui le précèdent incorpore l'ADN ou inhibe les enzymes de synthèse ou de réparation (ADN polymérase, ligases, topo isomérase, etc.) (Mutation du génome) (**Umbuzeiro et al., 2016**).

III.4.1. Mutation génétique

Les mutations génétiques correspondent à des changements dans la séquence nucléotidique de l'AND méthodes pour arrêter complètement la synthèse des protéines ou la modifier pour produire une protéine inactive. La mutation génétique la plus courante est une substitution, qui implique un remplacement un nucléotide est un nucléotide (**Ienga, 2012**).

III.4.2. Mutations chromosomiques

Les anomalies chromosomiques sont subdivisées en anomalies quantitatives (effets non génétiques) et Anomalies structurelles (effets tératogènes). Les aberrations chromosomiques peuvent chromatine (échanges, cassures...) ou chromosomes (affecte les deux chromatides d'un chromosome) Chromosomes : fragments acentriques, di centriques, translocations, etc.). perte correspondante (suppression) ou ajout (insertion) de segments chromosomiques, échanges entre segments duplications ou inversions de chromosomes et de segments chromosomiques non homologues (**Al-dualimi et al. 2018**).

III.5. Agents mutagène

Très peu de mutations spontanées lors de la réplication dues à l'activité correction pour l'ADN polymérase (3' 5' pour l'activité exo nucléase). Augmentation du mutagène taux de mutation au sein du génome (**Pedrazzani et al. 2012**).si certains gènes, ou des chromosomes entiers, souffrant de dommages permanents, peuvent muter, provoquant modification génétique de certains traits. les agents antimutagènes sont connus contre les effets des mutagènes (**Roberto et al., 2016**).la capacité d'un agent à modifier directement ou indirectement le patrimoine génétique d'une personnes cellules peuvent apparaître selon plusieurs mécanismes :

- Rruptures de brins d'ADN
- Rupture de deux brins d'ADN : dégradation
- Modifications de bases (thymine, cytosine, adénine, guanine) (**Roberto et al., 2016**).

III.5.1. Azide de sodium

L'azoture de sodium (NaN_3), qui fait partie de la famille des azotures, est un mutagène des produits chimiques bien connus qui provoquent des génomes eucaryotes ou les procaryotes (**Khan et al. 2011**).qui est un composé ionique dont la formule moléculaire est également soluble dans l'eau certaines solutions contiennent une quantité minimale d'azide d'hydrogène (**Qari, 2008; Khan et al. 2009**). L'azoture de sodium agit en interagissant avec l'ADN après infiltration dans le noyau. Il affecte différentes parties d'une plante et son développement en interférant avec son activité métabolisme (**Qari, 2008 ; Khan et al, 2009**).

III.6. Tests de génotoxicité

Les tests de génotoxicité sont utilisés depuis longtemps pour étudier le risque mutagène/cancérogène chez les travailleurs exposés à des agents génotoxiques. Elles forment une boîte à outils, actuellement la seule capable d'évaluer l'impact prématuré, entant que prédicteur du risque de cancer, l'exposition aux médicaments géotropiques (**Ortega,2004**). Ces essais ont pour but de mettre en évidence l'induction de modifications (endommagement ADN, mutation, transformation cellulaire, etc.) (**Hartmann et al., 2004**).cette différentes méthodes actuellement utilisées pour détecter (**Pillière et Falcy, 1991**).

Activité mutagène en milieu biologique :test d'Ames.

- ❖ **Changements cytogénétiques dans les cellules humaines**

- Aberrations chromosomiques.
- Cherchez des micronoyaux.
- Echange de chromatides sœurs.
- Test des comètes (test le plus récent).

❖ **Formation de liaisons sur l'ADN ou les protéines (adduits) :** adduits etADN, adduits de protéines et adduits d'hémoglobine.

III.6.1. Testes de mise en évidence d'un pouvoir mutagène au niveau génique

Il s'agit de tests mettant en évidence le potentiel génotoxique d'une substance, préparation ou extrait, en mesurant sa capacité à induire une mutation au niveau d'un gène chez des bactéries ou des cellules eucaryotes se traduisant par un effet phénotypique détectable..

III.6.1.1. Le test des comètes

Le test des comètes, ou Cometassay en anglais, encore appelé "single cell gel electrophoresis assay" (SCGE) ou "microgel electrophoresis assay" (MGE) mesure les cassures de brin d'ADN dans des cellules individuelles (**Rydberg et Johanson.1978**). Furent les premiers à déterminer les dommages de l'ADN dans des cellules individuelles incluses dans un gel d'agarose et lysées dans des conditions légèrement alcalines permettant un déroulement partiel de l'ADN. Après neutralisation, les cellules étaient colorées à l'acridine orange et les dommages de l'ADN étaient quantifiés en mesurant le rapport de la fluorescence verte (indiquant l'ADN double brin) et de la fluorescence rouge (révélant l'ADN simple brin). (**En 1984, Östling et Johanson**) ont ajouté une étape à cette technique : après la lyse des cellules incluses dans un gel d'agarose, elles subissent une électrophorèse dans des conditions neutres et sont marquées à l'aide d'un colorant fluorescent : le bromure d'éthidium. Lors de l'électrophorèse, les molécules d'ADN étant chargées négativement, les fragments cassés ou relâchés vont davantage migrer vers l'anode et former ainsi une image ressemblant fortement à des comètes. Le test était alors baptisé, il restait à (**Singh et al. 1988**) à améliorer ce protocole, car les conditions de lyse étaient inefficaces pour enlever toutes les protéines. Des conditions de lyse plus rigoureuses induisant la perte de 95% des protéines cellulaires ont été obtenues en réalisant les étapes de lyse et d'électrophorèse en conditions fortement alcalines (pH > 12,3) qui facilitent ainsi la dénaturation, le déroulement de l'ADN

et l'expression des cassures simple brin et des "lésions alcali-labiles" en plus des cassures double brin. Dans le domaine environnemental, le test des comètes a été appliqué avec succès à différents types d'organismes : plantes, vers, mollusques, poissons, amphibiens et mammifères. Nous ne détaillerons que les publications relatives à l'application de ce test aux plantes qui nous intéressent plus particulièrement, ayant déjà résumé les autres applications de ce test dans une revue (Cotelle, 1999). En outre, une revue de (Mitchelmore et Chipman, 1998). Consacrée uniquement aux organismes animaux aquatiques présente l'application de différentes méthodes d'analyse de la génotoxicité, dont le test des comètes.

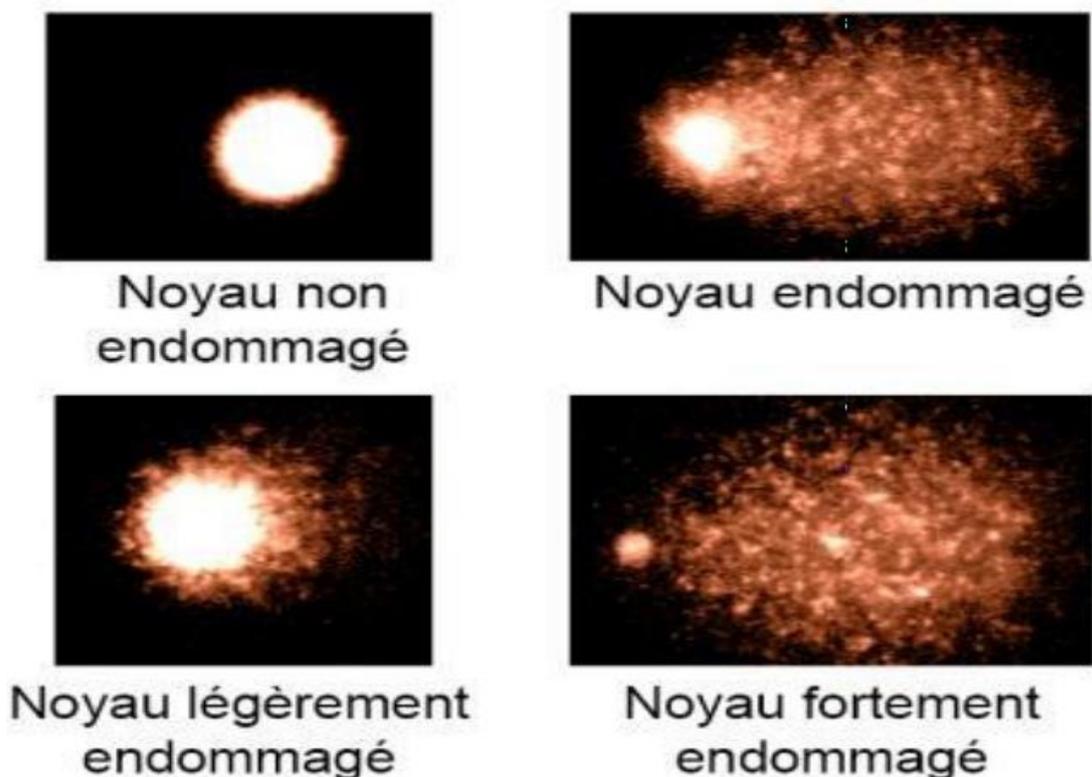


Figure 8: Observations des noyaux par les tests des comètes. (Lumière, 2014).

III.6.1.2. Test d'Ames

Décrit dans une série de publications au début des années 70 par Bruce Ames et son équipe de l'Université de Californie à Berkeley (Ames et al., 1973), le test d'Ames consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium* (Ames, 1973). Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu

sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ reversent spontanément vers His⁺ et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet, en quantifiant l'induction. Ces souches sont porteuses de mutations His⁻ différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés.

La grande majorité des produits pénétrant dans un organisme humain est détoxifiée afin d'être rapidement éliminée. Ce métabolisme conduit souvent à des espèces chimiques réactives intermédiaires électrophiles, qui sont les formes mutagènes ; le métabolisme ou bioactivation de beaucoup de composés génotoxiques est donc requis pour qu'ils exercent leurs effets délétères (**Guengerich, 2000**). Les systèmes enzymatiques, notamment les cytochromes P-450 qui interviennent dans ces réactions se situent principalement au niveau du foie et exigent des cofacteurs (oxygène et NADPH). Ils sont aussi inductibles. Dans le test d'Ames, ce métabolisme est mimé en mélangeant un homogénat de foie de rat (appelé fraction S9) avec les bactéries et les cofacteurs nécessaires (**Forster et al., 1980**). un traitement préalable des rats par un inducteur (généralement l'Aroclor 1254) assure la présence de tous les systèmes enzymatiques. Le test d'Ames consiste dans sa version classique standard à préparer une série de mélanges d'une quantité constante d'une des souches bactérienne et des quantités croissantes du produit à tester et à les étaler sur des boîtes de Petri contenant un milieu minimal. Ce milieu autorise la croissance des mutants His⁺ uniquement. Afin d'augmenter la sensibilité du test, une trace d'histidine est ajoutée qui permet la croissance de 2 à 3 générations de His⁻ et amplifie l'apparition des mutants. Après incubation de ces mutations réverses His⁺, de mesurer le potentiel génotoxique de la substance ou préparation étudiée.

Ceux-ci apparaissent sous la forme de colonies sur un tapis cellulaire translucide. Une courbe dose-réponse est tracée en portant en ordonnées le nombre de His⁻/boîte en fonction des doses testées. Le pouvoir mutagène est défini comme la pente de la région ascendante de la courbe (nombre de His⁺/μg ou nmole). Les résultats peuvent être exprimés aussi en nombre de révertants par boîte ; le pouvoir mutagène est avéré s'il y a 2 fois plus de révertants que dans la boîte contrôle (quotient revertants produit testé/revertants boîte contrôle >2). A côté de la méthode standard, il existe d'autres méthodes, notamment une micro méthode en milieu liquide réalisable en plaque 96 puits qui semble plus sensible que la méthode standard (méthode du test d'Ames par fluctuation) (**Bridges, 1980**). Une adaptation du test d'Ames à des souches bactériennes E. Coli déficientes en synthèse de tryptophane (souche WP2 uvrA) a

aussi été proposée (**Green and Muriel, 1976**). Le test d'Ames est applicable à l'étude du pouvoir mutagène de produits chimiques ou de mélanges, mais aussi de fluides biologiques telles que les urines chez les sujets exposés (**Mielynska et al., 1997**). Dans ce dernier cadre, il pourra servir de marqueur d'exposition en remplacement ou en complément du dosage direct analytique des composés chimiques mutagènes ou de leurs métabolites. Le test d'Ames a aussi été utilisé pour mesurer la génotoxicité de l'air d'ambiances de travail (**Teschke et al., 1989**).

III.6.2. Tests cytogénétiques

Il s'agit de tests basés sur l'étude des dommages chromosomiques et/ou chromatidiennes

Entraînées par l'exposition aux génotoxiques (**Muranli et al., 2015**). Parmi les tests cytogénétiques les plus répandus dans le domaine pharmaceutiques sont les tests d'aberration chromosomique et micronoyau.

III.6.2.1. Tests Aberrations chromosomiques

Sont des essais utilisés pour détecter les anomalies du caryotype sur des cellules eucaryotes exposées à des composés génotoxiques entraînant des cassures d'ADN (**Zeiger, 2001**).

Cette évaluation peut être établie *in vivo* par l'analyse des cellules comme les lymphocytes isolés de sujets humains ou d'animaux ou des cellules de lignée ou des lymphocytes exposés *in vitro* aux génotoxiques (**John, 1982**). Le caryotype est réalisé en bloquant les cellules en métaphase à l'aide de colchicine, puis en analysant le nombre de métaphases trouvées dans la culture. Plusieurs types d'anomalies chromosomiques peuvent être détectés, notamment les anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdie) ou les anomalies de structure des chromosomes (délétion, translocation, inversion...) (**Clare, 2012**). Les aberrations chromosomiques indiquent un dommage stable et persistant (mutation) qui représente un événement potentiellement initiateur dans le processus qui mène à la néoplasie. Le test est un biomarqueur d'effet précoce (**Eslava, 2004**).

III.6.2.2. Test des micronoyaux

Les micronoyaux sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal, provenant de la perte de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers pendant la division nucléaire, conséquences respectivement d'effets clastogènes (cassures double brin de la molécule d'ADN) ou d'effets aneugènes (altérations de l'appareil mitotique liées

principalement à des interactions avec les protéines). Les test des micronoyaux a donc pour objet de détecter et numérer ces micronoyaux, dans des cellules traitées in vitro par l'agent génotoxique ou provenant d'une exposition in vivo (par exemple des lymphocytes de rongeurs ou de sujets humains exposés à l'agent génotoxique) (**Mateuca et al., 2006**); il s'agit d'un cas particulier du test précédent (aberrations chromosomiques) qui va être applicable à l'analyse du potentiel génotoxique d'un composé ou à la surveillance de personnels exposés en médecine du travail (**Narod et al., 1988**). Les micronoyaux constituent un dommage stable et persistant (effet mutagène) qui persiste dans la cellule pendant la durée de vie de celle-ci, et il a donc une rémanence longue ; le test des micronoyaux a d'ailleurs été présenté récemment comme ayant une valeur prédictive pour le risque de cancer (**Bonassi et al., 2007**). Le test des micronoyaux peut être aussi utile pour évaluer une exposition récente (heures, jours). Applicable à toutes les cellules-cibles (cellules vésicales, endobuccales, fibroblastes, kératinocytes, etc...), ce test des micronoyaux peut notamment être appliqué aux lymphocytes T en culture utilisés comme cellules-modèles : il consiste alors à dénombrer les micronoyaux présents dans les lymphocytes T binucléés obtenus par blocage de la division cytoplasmique par de la cytochalasine B après une division nucléaire complète (**Mateuca et al., 2006**). L'avantage de cette technique est de ne comptabiliser que les lésions génotoxiques héritables (micronoyaux dans les seuls lymphocytes binucléés) répondant seules à la définition stricte de la mutation. Le test est, de plus, associable à une étude de la qualité du matériel génétique contenu dans le micronoyau (présence ou non de centromères, type de chromosome altéré, nature exacte de l'altération) par hybridation " in situ " fluorescente (technique FISH), ce qui apporte des éléments mécanistiques fondamentaux à l'interprétation des résultats (la détection des centromères dans les micronoyaux orientant vers un effet aneugène tandis que l'absence de cette détection oriente plus vers un effet lactogènes) (**Lewinska et al., 2007**). Le test des micronoyaux peut aussi être pratiqué directement sans culture préalable des lymphocytes recueillis par ponction sanguine chez les sujets exposés.

III.6.2.3. Echange de chromatides sœurs (SCE)

Ce test analyse des anomalies chromatidiennes survenant en réponse à l'exposition à un génotoxique (**Sram and Binkova, 2000**). Les échanges de chromatides sœurs entre chromosomes découlent de cassures dans l'ADN et de la réversion des fragments brisés à une position presque équivalente après échange entre les deux chromatides sœurs d'un même chromosome et par conséquent leur formation dépend de la phase S du cycle cellulaire ou des

processus de duplication de l'ADN. Les génotoxiques ou agents clastogènes augmentent la fréquence de SCE par cellules, ce qui serait lié à une action sur la réparation au cours de la phase S. Le test est applicable pour tester in vitro l'effet d'un composé sur des cellules mais aussi pour évaluer les effets d'une exposition in vivo à des agents génotoxiques. Il est donc utilisable pour la mesure du potentiel génotoxique d'un composé donné, mais aussi pour la surveillance de personnels exposés (**Maki-Paakkanen, 1987; Cavallo et al., 2006**).

La réalisation pratique du test nécessite d'effectuer une culture des cellules étudiées (souvent des lymphocytes) pour obtenir une mitose in vitro et un marquage des chromatides néosynthétisées lors de la mitose au bromo-desoxy-uridine, puis de procéder à une analyse caryotypique ou les chromosomes présentant des échanges de chromatides sœurs vont pouvoir être détectés. Le test va évaluer un événement stable, mais pas nécessairement une lésion fixée, exprimant la conséquence d'une exposition à des agents génotoxiques ; il n'est donc pas synonyme d'effet mutagène. Le test d'échange de chromatides sœurs n'est d'ailleurs pas prédictif du risque de cancers (**Norppa et al., 2006**). Le test d'échange des chromatides sœurs est sensible à certains facteurs confondants, notamment le tabac (**Lei et al., 2002; Milic et al., 2008**) et aussi la consommation d'alcool (**Karaoguz et al., 2005**). Le polymorphisme d'expression enzymatique constitue aussi un facteur interférent (**Wong et al., 2003; Norppa, 2004**).

III.6.2.4. Test *Allium Cepa*

Allium cepa ($2n = 16$), l'oignon, fait partie de la famille des alliacées. Cette plante est cultivée dans de très nombreux pays pour son usage alimentaire. Le caryotype présente cinq paires de chromosomes (de 8 à 16 μm) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites (**Grant, 1982a**). différentes variétés d'oignon peuvent être utilisées (**Ma et al., 1995**), dont notamment une variété mexicaine à petits bulbes, une variété américaine à gros bulbes jaunes et une troisième variété à petits bulbes blancs appelés, en France, oignons blancs printaniers. *Allium cepa* permet l'évaluation de divers critères de toxicité et de génotoxicité. Pour ce qui est de la toxicité, contrairement à *Vicia faba*, l'élongation racinaire d'*Allium cepa* est très souvent déterminée en parallèle avec les études de génotoxicité

(cf. revue de **Fiskesjö, 1997**). Ce critère présente une bien meilleure répétabilité et une plus grande facilité de mesure pour *Allium* que pour *Vicia* car les racines d'*Allium* poussent de façon très homogène et forment un ensemble de racines de longueur égale.

Critères de génotoxicité déterminés sur *Allium cepa*

Allium cepa est utilisé depuis longtemps dans les études sur les chromosomes et en particulier sur les effets des rayons X (**Marshak, 1937**) mais c'est Levan qui fut, en 1938, le premier scientifique à évaluer les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine. La modification du comportement mitotique due à la colchicine fut baptisé c-mitose qui se traduit en fait par une modification du nombre de chromosomes.

Les racines d'*Allium cepa* ont surtout été utilisées pour évaluer le nombre d'aberrations chromosomiques. Ce critère s'est avéré très sensible pour détecter le potentiel génotoxique de produits chimiques (**Fiskesjö, 1997**), métaux (**Fiskesjö, 1988 ; Liu et al., 1994a, b, c ; Borboa et De la Torre, 1996**) produits phytosanitaires (Butt et Vahidy, 1994) ou autres substances organiques (**Cortes et al., 1985**). La revue de Grant (1982a) montre que, sur 148 produits chimiques étudiés avec ce test, 76 % ont donné une réponse positive.

Ce test s'est également montré efficace dans l'étude de la génotoxicité de :

- sols prélevés dans la région de Tchernobyl et présentant une forte radio-activité (**Kovalchuk et al., 1998**).
- Lixiviats de déchets d'industries métallurgiques et chimiques (**Odeigah et al., 1997a**) .
- Eau de rivière (**Fiskesjö, 1985 ; Smaka-Kincl et al., 1996**) .
- Eau de pluie dans des régions industrialisées (**Al-Sabti, 1989**).
- Effluents industriels (**Smaka-Kincl et al., 1996**).
- Effluents de papeteries et d'industries métallurgiques et chimiques (**Nielsen et Rank, 1994**).- Effluents d'une raffinerie de pétrole (**Al-Sabti, 1989**).
- Effluents de tannerie (**Thangapandian et al., 1995**) .
- Effluents d'industries pétrochimiques (**Odeigah et al., 1997b**).

Partie II

Partie expérimental

Chapitre I :
Matériel et Méthodes
d'Analyse

I. Matériels et méthodes d'analyses

I.1. Matériels

I.1. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est:

- **Les feuilles d'*Origanum Majorana***: achetée du marché de Guelma. Après l'achat, le matériel végétal a été débarrassé des débris les feuilles sont ensuite broyées puis conservées dans des flacons.
- **Les bulbes de l'oignon (*Allium cepa*)** : ont été aussi achetés du marché local de Guelma. Le diamètre des bulbes varie entre [5 et 8cm], la couche externe des bulbes était éliminée ainsi que les anciennes racines avant de commencer l'expérience. Durant toutes les expériences réalisées, les bulbes étaient incubés à l'obscurité et à température ambiante.

I.2. Méthodes d'analyse

I.2.1. Screening phytochimique

C'est un essai in vitro de farine végétale pour la détermination initiale des différentes classes phytochimiques contenues dans la plante analysée (*Origanum majorana*). Le criblage phytochimique comprend des tests qualitatifs basés sur des réactions de coloration ou de précipitation plus ou moins spécifiques à chaque classe de principe actif. En fait, la première étape était de rechercher les principales classes de composés appartenant au métabolisme de la plante étudiée (**Trease et Evans, 1987**). On peut citer les principales classes de composés tels que : les Polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), les alcaloïdes, les saponines et les coumarines.

I.2.1.1. Flavonoïdes

À 6 g de la poudre végétale sont ajoutés à 150 ml d'eau distillée, le mélange était porté à ébullition pendant 15 minutes. Puis filtré et laissé refroidir (**Mbodj, 2003**).

❖ Coloration par le perchlorure de fer ($FeCl_3$)

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonctions phénoliques dans leurs squelettes, donnent des colorations variées avec des dilutions de $FeCl_3$. 4 à 5 gouttes d'une solution de $FeCl_3$ diluée à 4% sont ajoutées à 4 ml de solution extractive. L'apparition d'une coloration verdâtre, indique que le test est positif (**Mbodj, 2003**).

I.2.1.2.Saponosides

À 200 ml d'eau distillée bouillante sont ajoutés 2g de la poudre végétale, le mélange était maintenu un quart d'heure et après filtration le filtrat était ajusté à 200ml. 2ml du décocté à 20% étaient ajoutés à 20ml avec de l'eau distillée, le mélange était agité verticalement puis laissé reposer pendant 30min. L'apparition d'une mousse qui dure quelque instant indique la présence des saponosides. (**Karumi et al., 2004**).

I.2.1.3.Tanins

10g de poudre était suspendus dans 200ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 30 mn, le mélange était filtré puis le filtrat était mélangé avec de l'eau distillée à 200 ml. Il introduit 10 ml d'infusé à 10% dans un tube à essais, puis il est ajouté 2 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 2 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (**Edeoga et al., 2005**).

a) Tanins cachectiques

À 10ml de solution à 10% sont ajoutés 10 ml de l'HCl concentré. L'ensemble était porté à ébullition pendant 30mn puis filtré sur. En présence de tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge (**Edeoga et al., 2005**).

b) Tanins galliques : réaction de stiasny

À 30 ml de solution à 10% sont ajoutés 30 ml de réactif de stiasny, après chauffage au bain-marie à 90°C pendant 30mn et filtration le filtrat était saturé par 10g d'acétate de sodium. Ensuite, il était ajouté 2 ml d'une solution de FeCl₃ (à 2%), l'apparition d'une teinte bleu noire montre la présence de tanins galliques non précipité par réactif de stiasny (**Edeoga et al, 2005**).

I.2.1.4.Mucilages

À 2 ml du décocté à 20% étaient ajoutés 10ml d'éthanol absolu. Après une quelques minutes, l'obtention d'un précipité floconneux après agitation, indique la présence de mucilages (**Karumi et al. 2004**).

I.2.1.5.Coumarines

2g de la poudre végétale sont introduites dans un tube à essais, le tube était recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH il était ensuite placé dans un bain-marie pendant quelques minutes puis 1ml de NH₄OH (20%) sont ajoutés, deux taches de l'extrait ont été déposées sur un papier filtre et la révélation a été réalisée sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

I.2.1.6. Glycosides

10g de plante étaient additionnés à 100 ml d'une solution de l'acide tartrique 4% dans l'éthanol, le mélange est chauffé durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, le mélange était introduit dans l'eau chaude après une deuxième filtration, il était ajouté 4 gouttes de liqueur de Fehling à 4ml du filtrat, le chauffage au cours de la réaction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides (**Chaouch, 2001**).

I. 3. Détermination de la cytotoxicité par le teste *Alliums cepa*

I. 3.1. Préparation d'extrait aqueux d'*origainm majorana*

La méthode utilisée est elle de Bougandoura et Bendimerad (2012) modifiée. 200g de la poudre végétale (*OrganumMajorana*) ont été mises à une extraction par macération avec 1250 ml d'eau distillée, pendant 72H à température ambiante (environ 20°C), l'ensemble était filtré sur du papier filtre afin de séparer le marc du filtrat. L'extrait aqueux était ensuite lyophilisé.

I.3.2. Détermination de la quantité des polyphénols

a) principe de la méthode du dosage

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique du Folin-Ciocalteu (**Ragaeet al. 2006 ; Wong et al. 2006 ; Anthony, 2010**). Cet acide de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène W₈O₂₃ et de molybdène Mo₈O₃ (**Vipéreau, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximale est à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (**Ghazi et Sahraoui, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006**).

Materiels et méthodes d'analyses

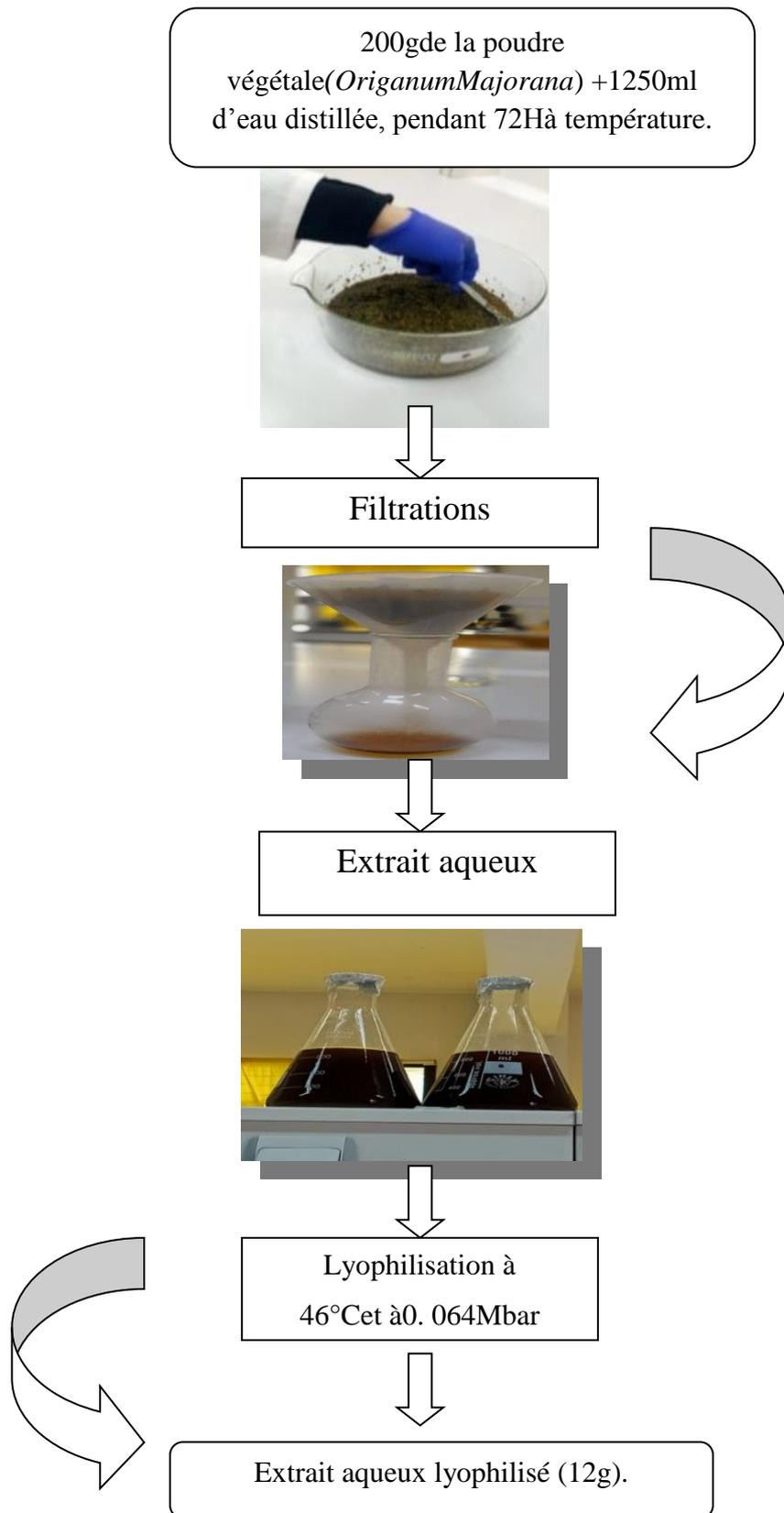


Figure 9: Protocole des différentes étapes de la préparation de l'extrait aqueux.

b) Mode opératoire

Les poly phénols totaux (**PPT**) ont été déterminés, suivant le protocole appliqué par Li et ces collaborateurs en 2007 ; Normal et Mardhiah en 2010) avec quelques modifications : 200µl d'extrait végétal aqueux (4mg/ml) ont été pipetés dans un tube à essai, mélangé avec 1ml de réactif du Folin Ciocalteu (FCR) dilué six fois dans de l'eau distillée. Après 4min, 800µl de carbonate de sodium (**Na₂CO₃**) avec une concentration de 75g/l ont été ajoutés et le mélange a été vortexé. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 2 heures de temps à température ambiante et à l'obscurité, L'absorbance était mesurée à 765nm par un spectrophotomètre UV-VIS, toutes les mesures ayant été répétées deux fois.

I.3.3. Etude de l'activité cytotoxique de l'extrait

I.3.3.1. préparations des racines d'*Allium cepa*

Les racines d'*Allium cepa* 1 à 2cm exposés pendant 24heure dans milieu minéral ce dernier était renouvelé et remplacé chaque 24H (2jour) les bulbes ont été choisis pour évaluations des effets cytotoxiques. Le milieu minéral est utilisé comme témoin **néгатif** (TM) pour toutes les manipulations.

I. 3.3.2. évaluation de l'effet cytotoxique

Les bulbes ont été divisés en 04lots, chaque lots contient 05bulbes. Les bulbes choisies pour l'évaluation des effets cytotoxiques et ont été immergées dans des milieux différents milieux :

- Quatre bulbes étaient cultivés dans le milieu minéral utilisé comme **témoin négatif**.

Douze bulbes ont été utilisés pour l'évaluation du test de cytotoxicité, de l'extrait aqueux. elles ont été immergées dans trois milieux différents chaque milieu est défini par sa concentrations à 25g/1L, 50g/L et 75g/L

I.3.2. Détermination de la quantité des polyphénols

a) principe de la méthode du dosage

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique du Folin-Ciocalteu (**Ragaeet al. 2006 ; Wong et al. 2006 ; Anthony, 2010**). Cet acide de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène W₈O₂₃ et de molybdène Mo₈O₃ (**Vipéreau, 1968**). La

coloration produite, dont l'absorption maximale est à 765nm, est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans les extraits (**Ghazi et Sahraoui, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006**).

-) mélange avec le milieu minéral pendant 24 h.

Douze bulbes sont utilisés pour évaluer l'activité anti-mutagénique l'extraits contre des cytotoxicité induites par l'azide de sodium, les bulbes sont placées dans des milieux avec différentes concentrations de Azide de Sodium(NaN_3) à 25g/1L , 50g/L et 75g/L pendant 24h, ce milieu et utilisé comme **témoin positive**.

I.3.3.Analyse macroscopique

Plusieurs paramètres ont été suivis Afin de signaler la présence ou l'absence d'un effet cytotoxique et/ou génotoxique ou anti-génotoxique, ces paramètres sont :

- ◆ La croissance.
- ◆ La couleur
- ◆ La forme.
- ◆ La rigidité.
- ◆ La taille des racines d'*Allium cepa*.

L'élargissement racinaire a été déterminée après 24 h de traitement par la solution d'*Origanum majorana* l'extrait et ces deux témoins positifs et négatifs.

I.3.4.Fixation de l'extrémité racinaire

les pointes de racines d'un centimètre (1 cm) de long étaient fixées dans le mélange Fraîchement préparé avec une volume d'acide acétique glacial et troisvolume d'éthanol à 95 % (1:3V/V) pendant 24 heures. Le but de la fixation est d'arrêter tout développement de la division cellulaire et de permettre le maintien de l'intégrité structurelle des chromosomes (**Jahier, 1992**). La racine fixée peu vent être stockés plusieurs mois dans de l'éthanol à 70% à 4°C.

L'éthanol a pour effet de précipiter et dénaturer les protéines, de dissoudre certains lipides et d'endurcir les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il précipite les protéines du noyau. Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans 2,5 ml de l'éthanol à 70% pour une observation différée ou bien être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate.

I.4 Etude statistique

Afin de déterminer l'effet de l'extrait aqueux sur l'élongation racinaire, une comparaison des moyennes a été réalisée par Excel state par le test de T de student au niveau $\alpha=0,05$.

Chapitre II :

Résultats et discussion

II.2. Résultats du dosage des poly phénols totaux

Un dosage des polyphénols totaux a été effectué afin de caractériser la teneur totale de l'extrait aqueux préparé à partir de la plante étudiée.

- La teneur a été déterminée par la méthode du folin Ciocalteu (**Ragaeet al. 2006 ; Wong et al. 2006 ; Anthony, 2010**), où l'acide gallique a été utilisé comme standard d'étalonnage (765nm), elle est exprimée en μg équivalent d'acide gallique par mg /d'extrait aqueux en utilisant la courbe d'étalonnage tracée avec l'acide gallique. Les résultats sont représentés dans (le **tableau04** et la **figure13**).

Tableau4: La teneur en composés phénoliques d'extrait aqueux

Extrait	quantité des polyphénols totaux (mg EA .G/g)
Extrait aqueux	125,73

La valeur présentée dans le tableau ci-dessus illustre la richesse de l'extrait aqueux en polyphénols.

Les résultats obtenus sont inférieurs de ceux obtenus par **Beuchikha et al ; 2003** qui ont enregistré une teneur en polyphénols égale à 125,73 mg.EAG/g pour *Origanum majorana* respectivement.

Par contre l'étude de **H. Sellami et al ; 2009**. Le taux obtenu des polyphénols était de 5.20 mg GAE/g. cette valeur est inférieure de celle obtenue dans la présente étude.

Cette variance peut être en raison de plusieurs facteurs notamment la présence dans les cellules végétales de différents types d'enzymes, susceptibles de changer les composés phénoliques (**Ribéraux, 1982**). en plus le contenu en polyphénols varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre. Ce qui est probablement dû au génotype et aux conditions agro climatiques (**Ebrahimi et al, 2008**). Ainsi la période de la récolte et le stade de développement de la plante.

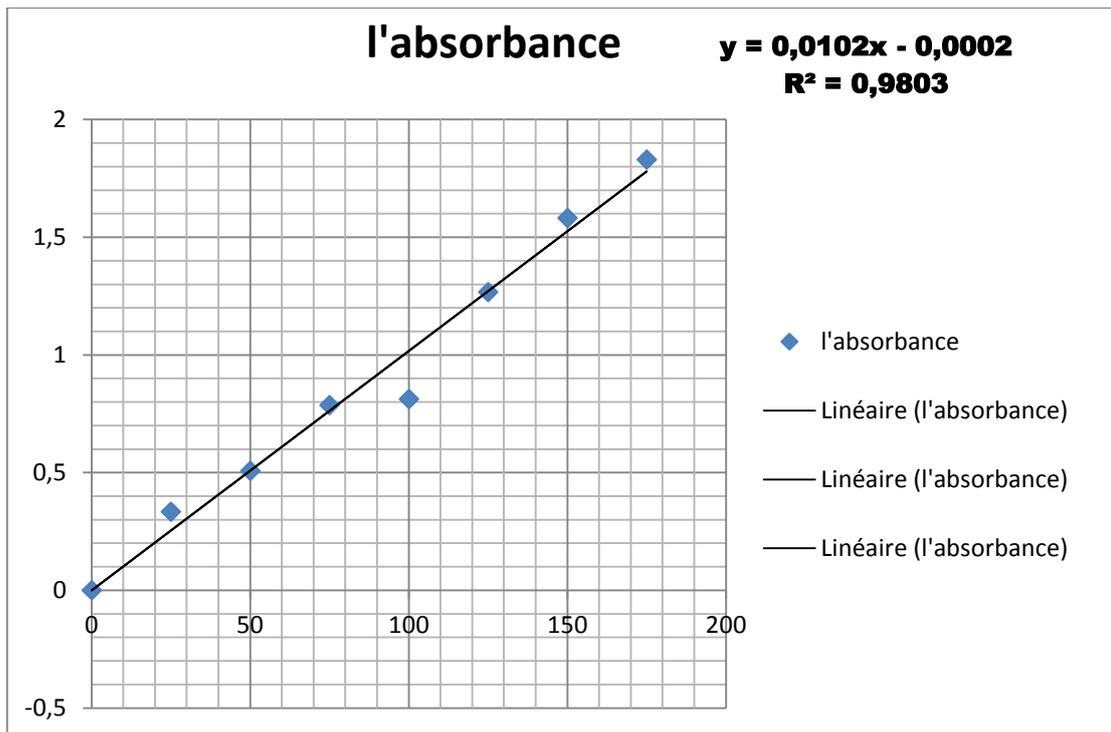


Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II.3.Évaluation del' effet cytotoxique

L'utilisation des plantes est principalement attribuable au fait que les tests de toxicité sont relativement simples à réaliser, peu coûteux, biologiquement sensible, et rapide. Par conséquent les tests de toxicité sur un modèle animal, prennent beaucoup de temps (Firbas et Amon, 2013).

Par ailleurs, l'espèce *Allium cepa* présente de nombreux avantages :

- La croissance des racines est très sensible aux différents polluants
- *L'Allium Cepa* a un nombre stable de chromosomes ($2n = 16$) avec une diversité morphologique des chromosomes
- Stabilité du caryotype, dont les phases mitotiques sont très claires
- Réaction claire et rapide aux substances génotoxiques. Raretés des dommages spontanés chromosomiques (Grant, 1982 ; Chauhan et al., 1999; Matsumoto, 2004 ; Matsumoto et al., 2006 ;)
- les cellules méristématiques des racines possèdent un système d'oxydation capable de déterminer les dommages chromosomiques ainsi que les perturbations du cycle cellulaire provoquées par les différents agents mutagènes.

- Le système de test *Allium cepa* fournit des informations importantes pour évaluer les mécanismes d'action d'un agent et ses effets sur le matériel génétique (**Lemeet al ., 2009**).

C'est pour cette raison, le modèle d'évaluation des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des feuilles *d'Origanum majorana* Sur les cellules méristématiques *d'Allium cepa* est choisi dans notre étude.

L'essai d'inhibition de l'élongation racinaire est couramment utilisé comme paramètre quantitatif pour évaluer la toxicité chez les plantes supérieures (**Wierzbicka, 1988**).

Cet indicateur très sensible a désigné que l'élongation racinaire était réduite dans les bulbes traités par l'extrait aqueux *d'Origanum Majorana* comparativement aux bulbes non traités (le contrôle négatif, notamment milieu minérale).

-Le traitement des bulbes par le milieu minérale pendant 24h avec a montré une bonne croissance des racines d'une couleur blanche, rigides et volumineuses. Tandis que le traitement des racines d'*Allium cepa* avec l'extrait *d'Origanum Majorana* provoqué un changement de forme et couleur (jaunâtres) des racines accompagné d'une perte de rigidité. Il a été remarqué que les racines ont perdu leur forme initiale et leur structure normale, elles ont été fragiles. Cependant une réduction significative des taux de croissance des racines a été observée.

Tableau 4: Résultats du test d'inhibition de la croissance des racines d'*Allium cepa* après 72h.

Bulbes	Concentration (25g/l)			Concentration (50g/l)			Concentration (75g/l)		
	Ea	NaN3	TM	Ea	NaN3	TM	Ea	NaN3	TM
1	0.5±0.21	0±0.28	5±0.35	1±0.35	0±0.18	5±0.35	1.8±0.21	0.5±0.35	5±0.35
2	0.8±0.39	0.4±0.21	4.5±0.35	0.5±0.71	0.25±0.18	4.5±0.35	1.5±0.35	0±0.18	4.5±0.35
3	0.25±0.53	0.1±0.07	5±0	1.5±0.21	0.5±0.35	5±0	2±0.35	0.25±0.18	5±0
4	1±0.53	0±0.07	5±0	1.2±0.21	1.5±0.35	5±0	1.5±0.35	0.5±0.18	5±0
moyenne	*** 0.64±0.12	0.13±0.09	NS 4.86 ±0.25	*** 1.05±0.17	0.19±0.09	NS 4.86±0.25	*** 1.7±0.5	0.31±0.06	NS 4.86±0.25
Pourcentage d'inhibition d'élongation racinaire (%)	13%	3%	100%	22%	4%	100%	35%	6%	100%

- NS :différences non significatives ($\alpha < 0,05$) .
- *** : différences très hautement significatives ($\alpha < 0,05$) .

Les plantes supérieures sont connues comme d'excellents modèles génétiques pour détecter les mutagènes environnementaux et sont fréquemment utilisés dans les études de suivi. Parmi les espèces végétales *Allium cepa* a été utilisé pour évaluer les dommages à l'ADN. (Morais Leme and, Marin-Morales .A. 2009).

La croissance à l'extrémité de la racine à l'extrémité de la pousse dépend du bon fonctionnement des méristèmes apicaux et de la transition des descendants de cellules méristématiques d'un état proliférant à l'allongement et à la différenciation (Scheres and Krizek.2017).

partie expérimental Résultats et discussion

Trois concentrations de l'extrait aqueux, du contrôle négatif (milieu minéral) et du contrôle positif (azide de sodium) ont été appliquées et ce pendant 3 jours avec un changement de milieu chaque 24h afin de déterminer leur effets sur l'élongation des racines de l'oignon. Ces concentrations sont respectivement (25,5, 75) mg/100ml.

Il a été remarqué que l'effet de que l'extrait est identique à celui de l'azide de sodium, ces derniers provoquent une réduction significative de la longueur des racines. Cependant le milieu minéral n'avait aucun effet, la croissance était normale aucune perturbation n'a été observée.

Les mêmes constatations sont faites par (Aria, 2014) dans son étude sur l'effet de cadmium sur la croissance racinaire de l'oignon.

Ceci est probablement dû à la présence dans la plante des molécules aux activités biologiques à effet nauséabond, entre autres, les hétéroglycosides et tanins. Ces ingrédients peuvent être présents à certains niveaux de concentration toxique, il s'agit de la première étude réalisée sur les effets cytotoxiques de l'extrait aqueux de la marjolaine pour tester *Allium cepa*.

Conclusion

Conclusion

Origanum majorana est une plante utilisée depuis longtemps en médecine peut avoir plusieurs avantages pour la santé.

L'extrait aqueux de cette plante a révélé la présence de Flavonoïdes, de Saponosides, de Polyphénols, de Tannins catéchiques, de mucilage et des glycosides et l'absence de tannins galliques, de coumarines et des alcaloïdes.

Le test *Allium cepa* est le test le plus utilisé pour détecter l'effet génotoxique et cytotoxique d'un produit donné. Le traitement des bulbes avec l'extrait étudié de la plante montre qu'il exerce une réduction du taux de croissances des racines comparativement au témoin.

En perspective, l'évaluation de plusieurs paramètres est nécessaire, notamment, l'indice mitotique et la mise en évidence des aberrations chromosomiques.

Résumé

Résumé

Origanum majorana est une plante médicinale aromatique annuelle de la famille des Lamiaceae, elle est utilisée depuis longtemps en médecine pour ses nombreux avantages pour la santé. Le screening phytochimique de l'extrait aqueux de cette plante a révélé la présence de Flavonoïdes, de Saponosides, de Polyphénols, de Tannins catéchiques, de mucilage et des glycosides et l'absence de tannins galliques, de coumarines et des alcaloïdes. Dans ce travail à l'évaluation de l'effet cytotoxique de la plante a été déterminé au niveau des cellules racinaires d'*Allium cepa*. Le milieu minéral utilisé comme témoin. L'élongation racinaire a été déterminée par l'utilisation d'un test d'inhibition de la croissance des racines. Les résultats obtenus ont montré que le traitement à 24h des bulbes avec l'extrait d'*Origanum Majorana* à concentrations (0.25, 0.50, 0.75) provoque une réduction importante de la croissance en longueur des racines comparativement au témoin. En conclusion, On prenant en considération l'effet cytotoxique *Origanum majorana* et leur utilisation en tant que plante thérapeutique.

Mots-clés : *Allium cepa*, cytotoxicité, Extrait aqueux, génotoxicité, *Origanum majorana*.

Abstract

Origanum majorana is an annual aromatic medicinal plant in the Lamiaceae family, it has long been used in medicine and may have several health benefits. The phytochemical screening of the aqueous extract of this plant revealed the presence of Flavonoids, Saponosides, Polyphenols, Catechic Tannins, mucilage and glycosides and the absence of gallic tannins, coumarins and alkaloids. In this work, the evaluation of the cytotoxic effect of the plant was determined at the level of the root cells of *Allium cepa*. The mineral medium used as control. Root elongation was determined using a root growth inhibition test. The results obtained showed that the 24-hour treatment of the bulbs with *Origanum Majorana* extract at concentrations (0.25, 0.50, 0.75) causes a significant reduction in root length growth compared to the control. In conclusion, taking into consideration the cytotoxic effect *Organummajorana* and their use as a therapeutic plant.

Keywords: *Allium cepa*, cytotoxicity, Aqueous extract, genotoxicity, *Origanum majorana*.

البردقوش هو نبات طبي عطري سنوي من عائلة *Lamiaceae* ، وقد استخدم طويلا في الطب وقد يكون لها العديد من الفوائد الصحية. كشف الفحص الكيميائي النباتي للمستخلص المائي لهذا النبات عن وجود مركبات Flavonoïdes, tannins galliques, Saponosides, Polyphénols, Tannins catéchiques, mucilage glycosides coumarines et alcaloïdes. في هذا العمل، تم تحديد تقييم التأثير السام للخلايا للنبات على مستوى الخلايا الجذرية. *Allium cepa* الوسيط المعدني المستخدم كعنصر تحكم. تم تحديد استطالة الجذر باستخدام اختبار تثبيط نمو الجذر. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن العلاج لمدة 24 ساعة للبصيلات بمستخلص بتركيزات (0.25g/l، 50g/l، 75g/l) أدى إلى انخفاض معنوي في نمو طول الجذر مقارنة بالمجموعة الضابطة في الختام، مع الأخذ بعين الاعتبار التأثير السام للخلايا *Origanum majorana* واستخدامها كنبات علاجي.

الكلمات المفتاحية: *Allium cepa* ، السمية الخلوية، المستخلص المائي، السمية الجينية، البردقوش.

Annexe

Annexe

Préparations des solutions suivantes

❖ **Solution d'Origanum Majorana**

Extrait de l'*Origanum majorana*1V

Eau distillé4V

❖ **Solution HCl (1N) à 8%**

HCl8,17 ml

Eau distillé91,83 ml

8,17 ml d'HCl sont ajoutés à 91,83 ml d'eau distillé.

❖ **Solution d'Acide Acétique Glacial à 45%**

Acide acétique glacial45 ml

Eau distillé.....55 ml

❖ **Solution de Carnoy**

Acide acétique lacial..... 1V

Éthanol pure (100%).....3V

Le Carnoy est composé d'éthanol 96% et d'acide acétique glacial, dans les proportions respectives : (3V /1V).

❖ **Colorant de Feulgen**

Fushine basique.....0,25 g

Eau distillé.....50 ml

HCl (1N)..... 5 ml

K₂S₂O₅.....0,5 g

0,25 g de Fushine basique est solubilisée dans 50 ml d'eau distillée bouillante (100°), après 10 minutes, 5 ml d'une solution 1N d'HCl sont ajoutées, l'ensemble est agité puis ajouter 0,5 g de métrasulfite de Potassium $K_2S_2O_5$, couvrir la solution par papier aluminium et la conservée à 4°C. Après 24h la solution est filtrée et peut être utilisée.

❖ **Réactif de MAYER**

Iodure de potassium (KI).....25 g
 Chlorure mercurique($HgCl_2$).....6,8 g
 Eau distillée.....1000ml

❖ **Réactif de Stiasny**

Formol à 40%.....10 ml
 HCl concentré5 ml

❖ **Préparations de solutions mères**

Extrait aqueux4g
 L'eau distillée.....400ml

❖ **Préparations de milieu minéral**

Tableau: compositions de milieu minéral selon (Rank et Nielsen(1997)).

<u>Les produits</u>	<u>Concentrations mg /L</u>
- $CaSO_4$	120
- $MgSO_4$	120
- $NaHCO_3$	192
- KCl	8

❖ Matériels de laboratoires

Tableau : Les matériels utilisé dans laboratoires.

<u>Appareillage</u>	<u>verrerie</u>	<u>Autres matériel</u>
L'étuve	Bucher	Micropipette
Bain mari	crystalliseur	pince
Agitateurs	Eprouvette	spatule
magnétiques	Entonnoir	papier de filtre
Balance analytique	tubes à essai	Lames et Lamelles
Spectrophotomètre	Pipette graduée	
Lyophilisateur		
Microscope		

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Akhtar, M.F., Saleem, A., Sharif A., Akhtar, B., Nasim, M.B., Peerzada, S., Raza, M., Ijaz, H., Ahmed, S., & Shabbir, M. (2016).** Genotoxic and cytotoxic action potential of Terminaliacitrina, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. Excli journal. 15:589-598.
- **Al-dualimi, D. W., Shah Abdul Majid, A., Al-Shimary, S. F. F., Al-Saadi, A. A., Al Zarzour, R., Asif, M., & Abdul Majid, A. M. S. (2018).** 50% Ethanol extract of Orthosiphonstamineus modulates genotoxicity and clastogenicity induced by mitomycin C. Drug and chemical toxicology. 41(1), 82-88.
- **Al-taisan W.A., 2014.** allelopathic effects of Heliotropiumbacciferum leaf and roots on Oryza sativa and Teucriumpolium .Life science jornal 11(8) :41-50.
- **Aria .SK,Mukherjee.A.2014.** Sensitivity of Allium cepa and Viciafobatowords cadmium toxicity.journal of soil science and plant nutrition .2014,14(2),447-458
- **Arnal-Schnebelen B. (2004).** La place de la phytothérapie dans l'arsenal des traitements mis en oeuvre par les médecins généralistes. Paris : Pierre Fabre.
- **Al-Sabti K (1989)** Allium test for air and water borne pollution control. Cytobios 58:71-78 .
- **Ames BN (1973)** Carcinogens are mutagens: their detection and classification. Environ Health Perspect6:115-118.
- **Ames BN, Durston WE, Yamasaki E and Lee FD (1973)** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. ProcNatlAcadSci U S A70:2281-2285.

B

- **Bach S., Piotton S., Vilarino R. et Waelti F. (2006).** Les médecines parallèles. Immersion en communauté. p 13.
- **Bakchiche B., Gherib A., Smail A., Cutodia G etGraca M. (2013).** Antioxydant activités of eight Algérien plant extracts and two essential oils. IndustrialCrops and Products, 46 : 85-96.
- **BalahbibA.,ElMeniy N.,Bouyahya A,...2021.** Phytochemistry, toxicology and pharmacological propertes of Origanumelongatim.
- **Besançon. (2012).** Progrès en dermato-allergologie. Groupe d'étude et de recherche en dermato-allergologie. Edition John libbeyeurotext. p 111.
- **Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M.** Les plantes dans la thérapeutique moderne, 2ème édition révisée, Ed. Maloine éditeur, 1986.

- **Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M.** *Les plantes dans la thérapeutique moderne*, 2ème édition révisée, Ed. Maloine éditeur, 1986.
- **Bia S.** 2019. Etude des activités biologiques de trois espèces du genre *Origanum*. thèse master : Université d'El Oued.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation. 3ème Ed. Paris. France. 1120p.
- **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulka-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H and Fenech M (2007)** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28:625-631.
- **Bridges BA (1980)** The fluctuation test. *ArchToxicol* 46:41-44.

C

- **(Cucurbitacées) Région de Oued N°39; sa (Wilaya de Ouargla).** Mémoire de Magister. Université d'Ouargla **2001**, 44.
- **Caroline G et Michel P. (2013).** Guide de poche de phytothérapie acné, migraine, ballonnements... Soignez-vous avec les plantes. Edition Quotidien matin. p 13-21.
- **Chabrier J. Y. (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Université Henri Poincaré, Nancy 1 faculté de pharmacie Année universitaire 2009-2010. p 107.
- **Chaouch N,** Etude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad
- **Chiavegatto, R. B., Chaves, A. L. A., Silva, I. C. A., dos Santos Lima, L. A. R., & Techio, V. H. (2017).** Cytotoxic and genotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St.-Hil (Solanaceae) on the cell cycle of *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 39(2): 201-210.
- **Colette C. (2007).** Aromathérapie et les huiles essentielles. Edition Masso/Réflexo. p 3.
- **Cavallo D, Ursini CL, Bavazzano P, Cassinelli C, Frattini A, Perniconi B, Di Francesco A, Ciervo A, Rondinone B and Iavicoli S (2006)** Sister chromatid exchange and oxidative DNA damage in paving workers exposed to PAHs. *Ann Occup Hyg* 50:211-218.
- **Clare Gill, 2012,** The In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. in: **James M. Parry et Elizabeth M. Parry,** Genetic Toxicology : Principles and Methods, Humana Press P 69-70.
- **Cortés F, Rodriguez-Higueras JM, Escalza P (1985)** Different cytotoxic effects induced by maleic hydrazide in root meristem cells. *Environ. Exp. Bot.* 25:183-188 .
- **Cotelle S, Masfaraud JF, Férard JF (1999)** Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research* 426:167-171.

D

- **Delattre, B. (2006).** Biologie : La mitose. Edition Dunod. p 1-21.
- **Diffley, J.F. (2004).** Regulation of early events in chromosome replication. *CurrentBiology*. 14: 778-786.

E

- **Edeogal H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O(2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of biotechnology* Vol. 4(7). P: 685-68.
- **Elord S., Stansfield W. (2003).** Génétique. 4^{ème} Edition. Dunod. Paris.
- **Eslava Ortega M.I. (2004).** Genotoxicitytests : Usefulness in occupational healthDifficulties encountered in their application to the workers medical survey. *Archives of Public Health*, 62. 71-81.

F

- **Fernandes, L.M., Gersez, W.S., Montovani , M.S., Figueiredo, P.O., Fernandes, C.A., Garsez, F.R, &Guterres, Z.R. (2013).**Assesment of the in vitro and in vivo genotoxicity of extractsandindolemonotherpene alkaloid from the roots of *Galianthethalictroides(rubiaceae)*. *Foodandchemicaltoxicology*. 59: 405-411.
- **Fiskesjö G (1988)** The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197:243-260 .
- **Forster R, Green MH and Priestley A (1980)** Optimal levels of S9 fraction in the Ames and fluctuation tests: apparent importance of diffusion of metabolites from top agar. *Carcinogenesis* 1:337-346.
- **Fiskesjö G (1997)** Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. Dans « *Plants for Environmental Studies* », édité par Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS. Lewis Publishers, New York, pp 307-333 .

G

- **Grant WF (1982a)** Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation Research*99:273-291 .

- **Green MH and Muriel WJ (1976)** Mutagen testing using TRP+ reversion in *Escherichia coli*. *MutatRes*38:3-32.
- **Guengerich FP (2000)** Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21:345-351.

H

- **Hanaoka, F. & Sugawara, K. (2016).**, recombination, and repair: Molecular DNA replication mechanisms and pathology. *DNA Replication, Recomb. Repair Mol. Mech. Pathol.* p 1-555.
- **Hartmann, A., Chumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L., 2004.** Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity.
- **Ha M, Yoo KY and Cho SH (2002)** Glycophorin A mutant frequency in radiation workers at the nuclear power plants and a hospital. *MutatRes* 501:45-56.

I

- **IESV (Institut européen des substances végétales.) (2015/2016).** Les plantes médicinales. Association loi 1901. Document réservé à l'usage des professionnels de la santé. p 3.
- **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., et al. (2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Edition Larousse. p 6-12.
- **Iengar, V. (2012).** characterization of complex chromosomal rearrangement. *Mutation Research.* 92: 3- investigations. *Mutagenesis* 19, 51–59.

J

- **John A, 1982,** Screening Chemicals for Mutagenicity: Practices and Pitfalls. in: *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology*, Academic Press, New York.

K

- **Kalitsis, P., Zhang, T., Marshall, K. M., Nielsen, C. F., & Hudson, D. F. (2017).** Condensin, master organizer of the genome. *Chromosome research.* 25(1): 61-76.
- **Khan, S., Ajmal, L., Tarroumi, M., & Ashrafi, M. (2011).** Detection of sodium azide induced mutagenicity in the regenerated Shoots of *Artemisia annual*, using internal transcribed spacer (ITS) sequences of rDNA. *Pakistan Journal of Botany.* 43(4): 2183-2186.

- **Klug, W.S., Cummings, M.R. & Spencer, C. A. (2006).** Génétique. 8^{ème} édition. Pearson. Paris. 872 p.
- **Kovalchuk O, Kovalchuk I, Arkhipov A, Telyuk P, Hohn B, Kovalchuk L (1998)** The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutat.Res.-Genet.Toxicol.E.M.* 415:47-57 .
- **Karumi Y., Onyeili P.A., Ogugbuaja V.O., 2004.** Identification of active principal of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf exact.*J Med Sci.* 4(3) :179-182.

L

- **LAIB I.(2011)**-Etude des activités antioxydant et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandulaofficinalis* sur les moisissures des légumes secs ., mémoire de magister . Université Mentouri Constantine.
- **LEMAOUI A. (2011)**- Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigellasativa*.L Algérienne., mémoire de magister, Université Ferhat Abbas-Setif.
- **Liman, R., Akyl, D., Eren, Y., and Konuk, M. (2010).**Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. *Chemosphere* 80, 1056–1061.
- **Lei YC, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Luo JC, Chang MJ and Cheng TJ (2002)** Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *MutatRes* 519:93-101.
- **Lewinska D, Palus J, Stepnik M, Dziubaltowska E, Beck J, Rydzynski K, Natarajan AT and Nilsson R (2007)** Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int ArchOccup Environ Health* 80:371-380.

M

- **Meijer L. (2003).**Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie.* 5: 311-326.
- **Morais Leme .D,Marin-Morales .A., 2009.** *Allium cepa* test in environmentalmonitoring : a review on its application .*Mutation research* 682(2009)71-81.
- **Moreau B. (2003).** Maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3^{ème} année de doctorat de pharmacie.

- **Muqaddas, Khera R. A., Nadeem F., Jilani M.I .(2016).** Essential Chemical Constituents and Medicinal Uses of Marjoram (*Origanum majorana* L.). *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences* 9 : 56-62..
- **Ma TH, Xu ZD, Xu CG, Mcconnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang HG (1995)** The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* 334:185-195 .
- **Maki-Paakkanen J (1987)** Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchanges in blood lymphocytes after occupational exposure to low levels of styrene. *MutatRes* 189:399-406.
- **Marshak A (1937)** The effects of X-rays on chromosomes in mitosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 23:362-369 .
- *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 23:362-369 .
- **Mielynska D, Braszcynska Z, Siwinska E, Smolik E, Bubak A and Sokal JA (1997)** Exposure of coke-oven workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results. *Am IndHygAssoc J* 58:661-666.
- **Milic M, Kasuba V, Orescanin V, Zeljezic D, Kopjar N and Rozgaj R (2008)** Chromosome damage in workers in cigarette manufacturing industry. *J ApplToxicol* 28:399-404.
- **Mitchelmore CL, Chipman JK (1998)** DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat.Res.-Fundam.Mol.Mech.Mut.* 399:135-147 .
- **Muranli, G., Dilek, F., Kanev, M., & Ozdemir, K, 2015,** Genotoxic effects of diazinon on human peripheral blood lymphocytes. *Arhivzahigijenu rada i toksikologiju*, 66(2), 153-158.

N

- **(Nabors, M. (2009).** *Biologie végétale. Structure, fonctionnement, écologie et biotechnologie.* Edition Pearson. Paris. 640p.
- **Narod SA, Neri L, Risch HA and Raman S (1988)** Lymphocyte micronuclei and sister chromatid exchanges among Canadian federal laboratory employees. *Am J Ind Med* 14:449-456.
- **Nielsen MH, Rank J (1994)** Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas* 121:249-254.
- **Norppa H (2004)** Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *ToxicolLett* 149:309-334.
- **Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Sram RJ, Knudsen LE, Barale R and Fucic A (2006)** Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 600:37-45.

O

- **OUIS N.(2015)**-Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil ,et de persil .,thèse doctorat ., Université Oran1.
- **Ortega, E.M.I., 2004.**Genotoxicity tests: Usefulness in occupational health Difficulties encountered in their application to the workers medical survey. Arch Public Health 62, 71–81.
- **Odeigah PG, Ijimakinwa J, Lawal B, Oyeniya R (1997a)**Genotoxicity screening of leachates from solid industrial wastes evaluated with the Allium test. ATLA-Altern.Lab.Anim. 25:311-321 .
- **Odeigah PGC, Nurudeen O, Amund OO (1997b)**Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. Hereditas. 126:161-167 .
- **Östling O, Johanson KJ (1984)**Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and biophysicalresearch communications 123:291-298.

P

- **Pererna .Vasudeva N. 2015.** Origanum majorana L. phyto-pharmacologique rêviez. Indian Journal of Natural Products and Resources 6(4) : 262-.
- **Petit J.M., et Julien R. (2007).** Mini manuel de génétique. Edition Dunod. Paris. 260p. pigmentosum par un test in vitro multiparamétrique, Thèse Doctorale de l'Université Joseph
- **Pillière F. et Falcy M. (1991).** Exposition aux produits chimiques génotoxiques : Marqueurs biologiques pour la surveillance des salariés. Documents pour le médecin du travail. 336p.
- **Pillière, F., Falcy, M., 1991.** Exposition aux produits chimiques génotoxique. Fiche medico- technique, Institut National de recherche et de sécurité, Paris, 330–336.
- **Prosser, S. L., & Pelletier, L. (2017).**Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. Nature ReviewsMolecularCellBiology. 18(3): 187-201.

Q

- **Qari Sameer, H. (2008).** In vitro evaluation of the anti-mutagenic effect of Origanum majorana extract on the meristematic root cells of Vicia faba. Qari / JTUSCI. 1: 6-11.

R

- **Raffin, A. L. (2009).** Phénotypage de la réparation de l'ADN de lignées Xeroderma significance and use in environmental monitoring. In In vitro Environmental Toxicology Concepts, Application and Assessment. Springer. Cham. pp. 59-80.
- **Robert P., Rey-Debove J. et Rey A. 2010.** Le nouveau Petit Robert de la langue française, dictionnaire alphabétique et analogique de la langue française. Edition Le Robert : Paris, France.
- **Roberto, M.M., Jamal, C.M., Malaspina, O., & Marin-Morales, M.A. (2016).** Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the Allium cepa test system. Genetics and molecular biology. 39(2): 257-269.
- **Royaume du Maroc,** Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc. Ministère de la santé (2016).
- **Rydberg B, Johanson KJ (1978)** Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: DNA repair mechanisms, edited by Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF. Academic Press, New York, pp 465-468.

S

- **SAIMI A. (2014)**-contribution a l'évaluation de la sensibilité d'Escherichia coli isolés d'infections urinaires communautaires aux quinolones et au extrait d'Origanum glandulosum et cynoglossum cheirifolium ., mémoire de magister., Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- **Scheres .B, Krizek.B .2017.** Coordination of growth in root and shoot apices by AIL/PLT transcription factors. Current opinion in plant biology 2018, 41:95-101.
- **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988)** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175:184-191.
- **Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M, Toman MJ (1996)** The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. Mutat. Res-Genetic Toxicology 368:171-179.
- **Sram RJ and Binkova B (2000)** Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. Environ Health Perspect 108 Suppl 1:57-70.

T

- **Tripathy B.,** Satyanarayana S., Abedulla Khan K., Raja K. 2017. An Updated Review on Traditional Uses, Taxonomy, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Origanum majorana*. *Int J Pharma Res Health Sci* 5 (4): 1717-1723.
- **Taylor. Francis., 2005.** *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*. Edited by Spiridon E. Kintzios. Agricultural University of Athens, Athens, Greece. 245p.
- **Teschke K, Hertzman C, Van Netten C, Lee E, Morrison B, Cornista A, Lau G and Hundal A (1989)** Potential exposure of cooks to airborne mutagens and carcinogens. *Environ Res* 50:296-308.
- **Thangapandian V, Sophia M, Swaminathan K (1995)** Cytological effect of tannery effluents on root meristems of *Allium cepa* Linn test system. *J. Environ. Biol.* 16:67-70 .

U

- **Umbuzeiro, G. D. A., Heringa, M., & Zeiger, E. (2016).** In vitro genotoxicity testing.

W

- **Walsh C. (2003).** *Nat. Rev, Microbiol*, 1 : 65-70.
- **Wong RH, Wang JD, Hsieh LL and Cheng TJ (2003)** XRCC1, CYP2E1 and ALDH2 genetic polymorphisms and sister chromatid exchange frequency alterations amongst vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers. *Arch Toxicol* 77:433-440.

Z

- **Zeiger Errol, 2001,** Genetic Toxicity Tests for Predicting Carcinogenicity. In : Choy, W. N. Genetic toxicology and cancer risk assessment, Marcel Dekker, New York.
- **ZENSANI L. 2014.** Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de thymus satureioides Coss et d'*Origanum compact Benth* et du genre nepeta et évaluation de leur propriété antibactérienne. thèse doctorat. Agdal : Université Mohammed V.
- **Zenanas L., (2014).** Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de thymus satureioides Coss et d'*Origanum compactum Benth* et du genre nepeta et évaluation de leur propriété antibactérienne. thèse doctorat. Université Mohammed V– Agdal.

Site web

- [Site1]. <https://www.carenity.com/infos-maladie/spondylarthrite-ankylosante/phytotherapie-ou-se-soigner-par-les-plantes-740>.
- [Site2] <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/phytoth%C3%A9rapie/15365>