

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Département : Biologie

Thème

Toxicités et activités biologiques d'une plantes médicinales « *Atractylis gummifera* »

Présenté par :

- Benyoub Amira

-Beraghta Mayssa

-Chirouf Assala

Devant le jury composé de :

Président : Zidi S

Université de Guelma

Examineur : Ferhi S

Université de Guelma

Encadreur : Boumaaza A

Université de Guelma

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, nous remercions «ALLAH» le tout puissant de nous avoir donné L'ambition, la santé, la force, la patience, la persistance et le courage pour accomplir ce modeste travail.

*Nous tenons à remercier sincèrement notre encadrante **Mme Boumaaza Awatif**, pour sa disponibilité ainsi que ses conseils judicieux, ses orientations et ses encouragements durant toute la période de réalisation de ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement à **Mme Zidi Sourour**, pour avoir accepté la présidence du jury de la défense pour cette mémoire, Grand et respectueux remerciement pour vos conseils ainsi que vos précieuses discussions*

*Nous remercions également **Mme Ferhi Sara** pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des sciences de la Nature et de la vie pendant les cinq années du notre parcours.

Nos remerciements vont aussi à toutes les techniciennes de laboratoires pour leur aide et disponibilité tout au long de la période du travail.

À toute les étudiants de la promotion

À toutes personnes ayant contribués de près ou de loin au bon déroulement de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mon chère père DJELOL

A ma chère mère MOUFIDA

Qui n'a jamais cessé de prier moi, de me soutenir

Cela m'aide à atteindre mes objectifs

A mes sœurs MADJDA et MARAM

A mes frères MOUHLAND et MAKREM

Pour son soutien moral et ses précieux conseils au long de mes études.

A mon mari LAMINE

Qui m'a toujours soutenu

A mes chères Trînomme AMIRA et ASSALA

Pour leur accord et leur sympathie

A mes chères aîmes AMIRA T et AMINA L

Pour leur aide et leur soutien dans les moments difficiles

A tout ma famille

Maysa

Dédicace

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

*Aux deux êtres les plus Chers **mes parents***

*Je vous remercie chaleureusement pour tout le soutien, l'encouragement
Que vous m'avez donné pendant toute ma vie, ainsi que pendant la période
de réalisation de ce modeste travail*

Que Dieu vous protège et vous garde pour moi.

*A mon seul et unique étoile, **Nessrine***

*Et mes chers frères : **Samí et Haïthem***

En témoignage de mon affection fraternel de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et succès, que DIEU vous préserve santé et longue vie.

*_A toute ma famille **Benyoub et Dahmane** surtout **mes grands- mères** pour leur amour et leur support continu*

*_ A ma très chère sœur **Chaïma**, puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.*

*_A ma petite princesse « **Chamoussa** » source de joie et de bonheur.*

*_A mes jolies partenaires : **Assala et Mayssa***

Qui ont participé à ce travail avec diligence et maîtrise .

*_A toute mes chères amis et mes proches surtout: **B.Amira, Hadil, T.Amira** et a tous ceux que j'aime et qui m'aimen.*

AMIRA

DÉDICACE

*Ma très chère mère **MANEL** vous avez toujours été mon école de patience, de Confiance et surtout d'espoir et d'amour.*

*Mon très cher père **MOUHAMMED** qui a œuvré pour ma réussite, de par son Amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour sa présence dans ma vie.*

*À ma adorables sœur **KHADIJA***

En témoignage de l'attachement et de l'amour que j'ai pour elle, j'Implore Allah de te réserver un bon avenir.

*À mon unique frère **ABDELLAH***

A qui je souhaite la réussite et tous le bonheur du monde, et que dieu le protège.

*À **ABD EL MONAIM** qui m'a toujours soutenu, encouragé et poussé m'adonner le meilleur de moi-même. Que DIEU le tout-puissant te préserve, t'accorde santé et bonheur.*

*À Mes jolies binômes et amies : **AMIRA** et **MAISSA** Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.*

ASSALA

Résumé :

Le but de ce travail était d'aborder une plante ornementale toxique : *Atractylis gummifera* L. Dans la présente étude, le potentiel génotoxique du rhizome aqueux d'*Atractylis gummifera* a été déterminé dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*. La valeur EC50 a été déterminée à l'aide d'un test d'inhibition de la croissance des racines. L'indice mitotique (IM) dans tous les traitements par rapport au groupe témoin a diminué de manière dose-dépendante. D'autre part, *Atractylis gummifera* a affecté le pourcentage de phases mitotiques et a augmenté de manière significative la fréquence des cellules anormales.

L'activité antioxydante, antibactérienne et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* a également été évaluée. L'activité antioxydante de l'extrait aqueux et méthanolique est étudiée par la méthode DPPH et montre une activité élevée avec une IC50 de 4,43 mg/ml l'extrait aqueux et une activité inférieure à 51,63 mg/ml dans l'extrait méthanolique.

L'activité anti-inflammatoire utilisant la méthode d'inhibition de la dénaturation de la BSA a révélé que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique exercent un effet modéré à faibles doses mais provoquent une dénaturation lorsque les concentrations augmentent. Un effet hémolytique accompagné de lésions membranaires a également été enregistré. Aucune activité antibactérienne n'a été retrouvée contre 3 souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *Atractylis gummifera*, génotoxicité, *Allium cepa*, activité antioxydante, DPPH, activité antibactérienne, activité anti-inflammatoire

Abstract :

The aim of the present work was to approach one ornamental toxic plant: *Atractylis gummifera* L. In the present study, the genotoxic potential of the aqueous *Atractylis gummifera* rhizoma was determined in the root cells of *Allium cepa*. The EC50 value was determined using a root growth inhibition test. The mitotic index (MI) in all treatments compared to the control group decreased in a dose-dependent manner. On the other hand, *Atractylis gummifera* affected the percentage of mitotic phases and significantly increased the frequency of abnormal cells.

The antioxidant, antibacterial and Anti-inflammatory activity of the aqueous and methanolic extract of *Atractylis gummifera* was also evaluated. The Antioxidant activity of aqueous and methanolic extract is studied by the DPPH method and shows a high activity with an IC50 of 4.43 mg/ml in the aqueous extract and a less activity 51.63 mg/ml in the methanolic extract.

The anti-inflammatory activity using the method of inhibition of BSA denaturation revealed that the aqueous extract and methanolic extract exert moderate effect at low doses but cause denaturation when concentrations rise. Hemolytic effect accompanied with membrane damage was also recorded. No antibacterial activity was found against 3 bacterial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Atractylis gummifera*, genotoxicity, *Allium cepa*, antioxidant activity, DPPH, antibacterial activity, anti-inflammatory activity.

ملخص

كان الهدف من هذا العمل معالجة نبات الزينة السام : علك الداد في هذه الدراسة ، كانت الإمكانيات السمية الجينية للمستخلص المائي باستخدام اختبار تثبيط نمو الجذر. حيث انخفض مؤشر EC_{50} من علك الداد تم تحديده في الخلايا الجذرية للبلبل. تم تحديد قيمة الانقسام في جميع العلاجات مقارنة بمجموعة التحكم بطريقة تعتمد على الجرعة. من ناحية أخرى، أثر علك الداد على النسبة المئوية للمراحل الانقسامية وزاد بشكل كبير من تواتر الخلايا غير الطبيعية.

تم أيضًا تقييم النشاط المضاد للأوكسدة والمضاد للبكتيريا والمضاد للالتهابات للمستخلص المائي والميثانولي لعلك الداد. النشاط المضاد بمقدار $IC_{4.43}$ وأظهر النتائج نشاطًا عاليًا مع تركيز DPPH للأوكسدة للمستخلص المائي والميثانولي تمت دراسته بطريقة ميكروغرام / مل من المستخلص المائي ونشاط أقل بمقدار 51.63 ميكروغرام/ مل في المستخلص الميثانولي أوضحت أن المستخلص المائي والمستخلص الميثانولي لهما تأثير BSA النشاط المضاد للالتهابات باستخدام طريقة تثبيط تمسخ معتدل عند الجرعات المنخفضة ولكنهما يسببان تمسخًا عند زيادة التركيزات. كما تم تسجيل تأثير انحلالي مصحوب بتلف الغشاء لم يتم العثور على أي نشاط مضاد للجراثيم ضد 3 سلالات بكتيرية: الإشريكية القولونية ، الزائفة الزنجارية ، المكورات العنقودية

الكلمات المفتاحية: علك الداد، السمية الجينية، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للالتهاب، النشاط المضاد للبكتيريا

Sommaire

Lise des tableaux

Liste des figures

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie I : Synthèse bibliographique

I- Généralité sur la plante étude

I-1 Définition d' <i>Atractylis gummifera</i>	2
I-2 Classification.....	2
I-2-1 Systématique	2
I-2-2 Nomenclature	3
I-2.3 Synonymes botanique	3
I-3 Distribution géographique.....	3
I-4 Description botanique	4
I-4-1 Partie aérienne	4
I-4-2 Partie souterraine	7
I-5 Etude chimique du <i>Chardon à glu</i>	8

I-5-1	Composition chimique	8
I-5-2	Les principes actifs	9
I.6	Usage en Algérie	13
I-6-1	Usage traditionnels	13
I-6-2	Usage criminels	13
I-7	Partie et principe toxique	14
I-8	Mécanisme d'action toxique.....	14
 II. Génotoxicité		
II.1.	Définition.....	15
II.4.	Les tests de génotoxicité	15
II-4.1.	Test de comète	15
II-4.2.	Test de micronoyaux	16
II-4.3.	Test de échanger entre chromatide sœur	16
II-4.4.	Test d'aberration chromosomique	17
II-4.5.	Test d'Allium cepa.....	17
 III. Activités biologiques		
III-1	Activité antioxydante.....	19
III-2	Activité anti-inflammatoire.....	20
III-3	Activité antibactérienne.....	21

Partie 02: Etude expérimentale

Matériels et méthodes

1-Collection des plantes	23
2- Préparation de l'extrait	23
3- Test de cytotoxicité et de génotoxicité sur Allium cepa	24
4-Etude de l'activité antioxydante par le test de DPPH.....	28
5-Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro	29
5-1 Test d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines.....	29
5-2 Test de l'effet hémolytique.....	30
5-3 Dosage de l'MDA.....	31
6-Activité antibactérienne.....	32

Résultats et discussion

1-Test Allium cepa.....	35
1-1 Test de cytotoxicité et inhibition de l'élongation racinaire.....	35
1-2 Test de génotoxicité.....	36
1.2.1- Indice et phases mitotiques.....	36
1.2.2- Aberrations chromosomiques.....	38
2- L'évaluation de l'activité antioxydante.....	41
2-1 Le piégeage du radical libre DPPH.....	41
3- Activité anti-inflammatoire.....	43
3-1 Test de dénaturation de BSA.....	43

3-2 Test d'hémolyse (test d'innocuité) sur les globules rouges.....	45
3-3 Test de peroxydation lipidique in vitro.....	46
4- L' activité antibactérienne.....	46

Conclusion

Référence bibliographique

Annexes

Liste des abréviations

AG	<i>Atractylis gummifera</i>
AC	Aberration
AIS	Anti Inflammatoire Stéroïdien
AINS	Anti Inflammatoire non stéroïdien
BSA	Albumine de Sérum Bovine
DPPH	1.1-diphényl-2-pyrcil-hydrazyl
EDTA	Acide éthylène diamine téraacétique
GR	Globule Rouge
HCL	Acide Chlorhydrique
IC 50	Concentration Inhibitrice 50%
KH₂PO₄	Potassium dihydrogène phosphate
K₂HPO₄	Di Potassium hydrogène phosphate
MN	Micronoyau
MeOH	Méthanol
MDA	Malon aldéhyde
NaCL	Chlorure de sodium
OH	Radical hydroxyle
SCE	Echanges de chromatides Sœurs
TBA	Acide Thiobarbiturique
TCA	Acide Trichloracétique
TBS	Tris Buffer Saline

Liste des figures

Figure 1 :	<i>A. gummifera</i>	02
Figure 2 :	Réparation géographique <i>d'A-g</i>	04
Figure 3 :	la tige <i>d'A- gummifera</i>	04
Figure 4 :	Feuille <i>d'A-g</i> disposés en rosette	05
Figure 5 :	inflorescence <i>d'A-g</i>	05
Figure 6 :	Bractée externe <i>d'A-g</i>	06
Figure 7 :	Fleuron isolé du capitule <i>d'A-g</i>	06
Figure 8 :	capitule floral desséché	07
Figure 9 :	Rhizome <i>d'A-g</i>	07
Figure 10 ;	Echange ATP/ADP à travers la membrane mitochondriale	14
Figure 11 :	évaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes à l'aide du test des comètes	16
Figure 12 :	Mécanisme de test MN	17
Figure 13	Mécanisme d'action des AIS	20
Figure 14	Préparation d'extrait	23
Figure 15	oignons dans les gobelets pour le traitement	24
Figure 16	Préparation des lames	25
Figure 17	Les bulbes de <i>Allium cepa</i> avec de nouvelles racines	25
Figure 18	Photographie de la fixation des racines dans le carnoy	26
Figure 19	Photographie de la coloration des extrémités des racines	26

Figure 20	Ecrasement des pointes racinaires sur la lame	
Figure 21	Réaction entre le DPPH+ et le composé antioxydant pour former le DPPH	28
Figure 22	Protocole du test d'inhibition de la dénaturation thermique du BSA	30
Figure 23	Effet inhibiteur des différentes concentrations d' <i>A. Gummifera</i> sur l'élongation racinaire d' <i>Allium cepa</i>	36
Figure 24	les différentes phases mitotiques normales chez <i>Allium cepa</i>	39
Figure 25	les différentes aberrations chromosomiques observées dans les extrémités des cellules racinaires d' <i>A.cepa</i> exposé à différentes concentrations de l'extrait aqueux d' <i>AG</i>	40
Figure 26	Effet scavenger de l'extrait méthanolique d' <i>Atractylis gummifera</i> sur le radical	41
Figure 27	Effet scavenger de l'extrait méthanolique d' <i>Atractylis gummifera</i> sur le radical	42
Figure 28	Effet scavenger de l'acide ascorbique sur le radical DPPH	43
Figure 29	Les résultats d'activité antibactérienne après l'incubation	47

Liste des tableaux

Tableau 1	Effet d' <i>A. gummifera</i> sur l'élongation racinaire chez <i>Allium cepa</i>	35
Tableau 3	effet d' <i>A. gummifera</i> sur l'indice mitotique des cellules méristémiques des racines d' <i>Allium cepa</i>	37
Tableau 3	effet d' <i>A. gummifera</i> sur les phases mitotiques des cellules méristémiques des racines d' <i>Allium cepa</i>	37
Tableau 4	effet d' <i>A. gummifera</i> sur les aberrations chromosomiques totales (ACT)	39
Tableau 5	Le pouvoir antioxydant in vitro exprimé par IC50 des extraits testés	41
Tableau 6	Effet des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Atractylis gummifera</i> sur l'MDA dans	44
Tableau 7	Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Atractylis</i> <i>gummifera</i> sur contre la dénaturation du BSA	45
Tableau 8	Effet hémolytique (test d'innocuité) des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Atractylis gummifera</i> sur les globules rouges	46

Introduction

Introduction :

Depuis l'antiquité, l'humanité utilise les plantes médicinales comme remèdes pour diverses maladies, afin de soulager leurs douleurs et panser leurs blessures, parce qu'elles contiennent des composants riches en principe thérapeutique (Khaldi A et *al.*, 2012). La relation entre l'homme et les plantes n'était pas limité aux seuls médicaments, mais aussi dans la satisfaction des besoins nutritionnels (Hafidi K, 2014).

Cependant, malgré les avantages thérapeutiques profonds que possèdent les plantes médicinales, certains de leurs constituants se sont révélés de graves toxiques pour l'homme potentiellement mutagènes, cancérogènes ou tératogènes (Aouadhi S, 2010).

Atractylis gummifera (le *Chardon à glu*) est une plante médicinale de la famille des Asteraceae, largement répandue dans les pays du bassin méditerranéen, communément utilisée en Algérie dans la gestion traditionnelle de différentes maladies (Larabi et *al.*, 2012).

Cette plante provoque chaque année des intoxications graves et souvent mortelles. D'après plusieurs travaux, le *Chardon à glu* peut conduire à la mort après une hépatite aiguë, une hypoglycémie sévère et une insuffisance rénale. (Hamouda C, 2004).

Les objectifs de la présente étude sont :

- Évaluer la toxicité et la génotoxicité de l'extrait aqueux d'*Atractylis gummifera* en utilisant le test *Allium cepa*.
- Évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique par le test de DPPH *in vitro*.
- Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis de trois Souches par la méthode de diffusion sur gélose.
- Évaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique par le test d'inhibition de la dénaturation protéique, et le test de stabilisation de la membrane des globules rouge (test d'hémolyse)

I- Généralité sur la plante étude :

I-1 Définition d'*Atractylis gummifera* :

A-gummifera plante que l'on trouve en Afrique du Nord, comme l'Algérie, le Maroc et la Tunisie, et qui appartient à la famille des Astéracées. Provoquer une intoxication grave, Selon le bilan du Centre Anti-Poisons d'Alger (période 1991 à 2009), La première plante toxique avec un pourcentage de 10% (Larabi I A, 2012).



Figure 01 : *Atractylis gummifera* (Vladimirov V et *al.*, 2012).

I-2 Classification :

I-2-1 Systématique :

Embranchement Embryophytes

Sous-embranchement Trachéophytes

Super classe Spermaphytes

Classe Angiospermes (monophylétique)

Sous-classe Asterideae

Clade Triporées évolués

Ordre Astrales

Famille Asteraceae

Sous famille carduoidées

Genre *Atractylis*

Espèce *Atractylis gummifera* L (Benamrouche M et al., 2021).

I-2-2 Nomenclature :

Nom scientifique *Atractylis gummifera* L

Noms vernaculaires :

Arabe Addad, Chouk el eulk, Laddad .

Berbère Akhfioun, Taboune khart, Tifrioua, Tilisten, laddad .

Français Chardon à glu, Caméléon blanc, Carline à gomme .

Italien Masticogna, Laticifera .

Anglais Stemless, Atractylis, Bird-lime, Glue thistle (The Euro + Med Plantbase Project (en ligne, 2021).

Synonymes botanique :

Carlina gummifera DC

Carlina gummifera Less

Acarna gummifera Brot

Acrna gummifera Willd

Acoma gummifera Brot (Benamrouche M et al., 2021).

I-3 Distribution géographique :

Atractylis gummifera L est abondant autour de la Méditerranée, en Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) et surtout en Europe du Sud (Italie, Grèce, Espagne et Portugal) (Zaim N, 2007).

La plante se trouve en Algérie sur toute la cote, du niveau de la mer jusqu'aux sommets du Thabor et de Ouarensenis, c'est-à-dire les plaines et les montagnes. C'est une espèce très rustique qui s'adapte à tous les types de sols, mais les sols limono-sableux meubles et profonds semblent être son milieu de prédilection (Edmond Lefranc M ,2014).

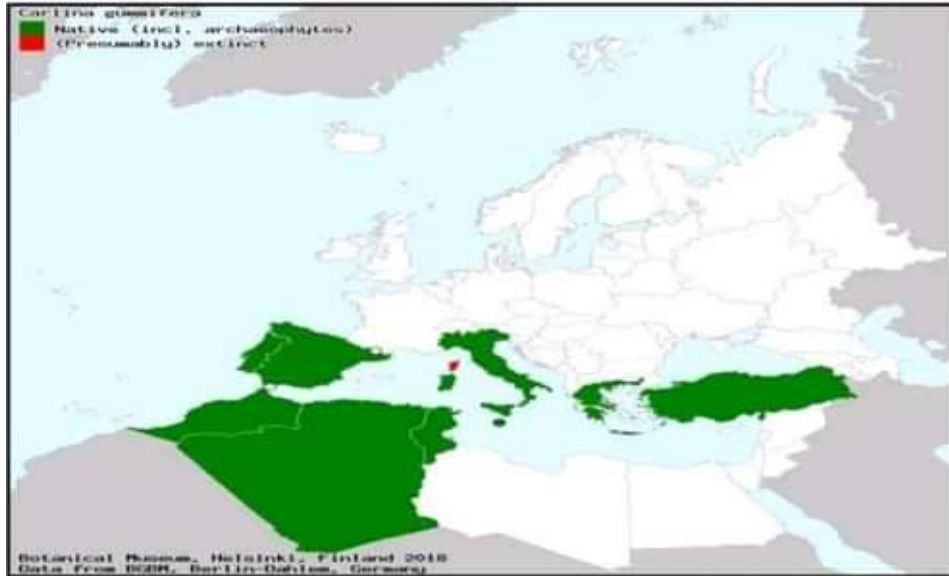


Figure n°02 : Répartition géographique d'*Atractylis gummifera*

(The Euro+Med plantbase project « En ligne », 2021)

I-4 Description botanique :

A.gummifera c'est une plante d'herbes aromatiques, avec des parties bien développées sous le sol (rhizome souple et racines charnues). Il ressemble à l'artichaut sauvage (Ahid et al., 2012).

I-4-1 Partie aérienne :

La tige :

Le plant *A-gummifera* est une plante acaule (n'a pas de tige) (Ait Youssef M, 2006).



Figure n°03 : la tige de d'*Atractylis gummifera* (Vladimirov V et al., 2012).

Feuille :

Sa longueur est de 10-25cm, trouvées en hiver, à pleines dents et piquant, formant une rosette (Benamrouche M, 2021).



Figure n°04 : Feuille d'*Atractylis gummifera* disposés en rosette (Flora-on 2021)

(En Ligne) [https://flora-on.pt /](https://flora-on.pt/)

Inflorescence :

Il est composé de gros fleurons, souvent avec une seule tête, mais parfois il a plus tête. Son diamètre 6-10 cm. Il est cylindrique et entouré de bractées forment un involucre dit gommifère (Aït Youssef M ,2006).



Figure n°05 : inflorescence d'*Atractylis gummifera*

(Motore di ricerca naturalistico 2021)(En ligne)

Bractées :

Les bractées sont disposées en trois couches consécutives : les bractées internes sont silencieuses, rouge violacé vers le haut ; les bractées médianes ont des épines faibles ; les bractées externes sont oblongues, se rétrécissant en épines robustes avec des dents palmées à marges multiples (Benamrouche M, 2021).



Figure n°06 : Bractée externe d'*Atractylis gummifera* (Benbouziane FZ, 2016).

Fleurs

Les fleurs qui apparaissent entre juin et juillet sont hermaphrodites, allant de 3 à 7 cm de diamètre. Ils peuvent être de couleur rose, violet. Ce sont de petites fleurs tubulaires qui poussent souvent sur des feuilles fanées. Les fleurs sont regroupées en inflorescences simples ou doubles (Benamrouche M, 2021).



Figure n°07 : Fleuron isolé du capitule d'*Atractylis gummifera* (Benbouziane FZ ,2016).

Fruit

Le fruit est un akène velu portant une fleur. Après la fructification, il suinte un latex blanc jaunâtre dans les fissures de la tête, se figeant sous forme de chewing-gum. C'est pourquoi il s'appelle « El eulk » (Hammiche V, 2013).



Figure n°08 : capitule floral desséché (Merad R,1973)

I-4-2 Partie souterraine :

Organes souterrains, charnus à l'état frais, constitués d'un gros rhizome principal (30-40cm ou plus de longueur et 1-20cm de diamètre) en forme de navet avec fines racines et des rhizomes rampants, de section très dure, fibreux, jaunâtre, montrent rayures concentriques (Hammiche V, 2013).



Figure n°9 : Rhizome d'*Atractylis gummifera* (Benbouziane FZ, 2016)

I-5 Etude chimique du Chardon à glu :

I-5-1 Composition chimique :

✓ Partie souterraine : racine

D'après l'analyse du LEFRANC des racines *d'Atractylis gummifère L.* Collectées dans la région de Mostaganem en avril 1866 et desséchées à l'air, a donné les proportions suivantes pour les composants ci-dessous :

- Inuline (46,5 %)
- Sucres (8 %)
- Cellulose (25 %)
- Matières minérales (4.5 %)
- Eau (4 %) (Lefranc E, 1866).

Il existe également d'autres composés énumérés ci-dessous :

- Des hétérosides diterpénique (carboxyatractyloside et atractyloside).
- Des hétérosides flavonoïdique (orientine, homo-orientine, néocorymboside, corymboside).
- L'asparagine.
- Des acides aminés (Acide aspartique et glutamique, proline, leucine, Valine, et tryptophane).
- Divers acides organiques (Acide acétique, oxalique et malique, isovalérianique).
- Trace d'huile essentielle (Ait Y, 2006).

LEFRANC a mené des recherches sur les cendres de la racine *d'Atractylis gummifera*. Cette racine dégage une forte odeur de caramel et contient les composants suivants : la chaux, la soude, la magnésie, la potasse et du fer d'une part, d'autre part, L'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide carbonique et de la silice (Hammiche V et *al.*, 2013) .

I-5-2 Les principes actifs :

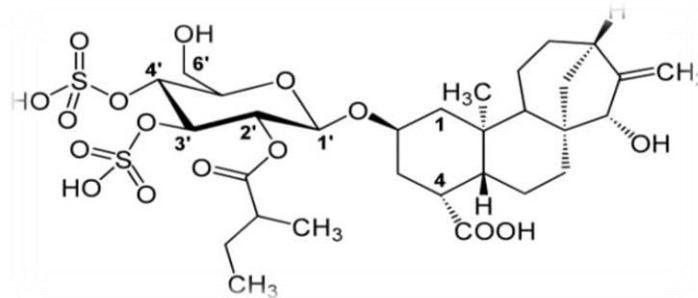
Hétérosides diterpénique :

L'atractylis gummifera contient des puissants hétérosides hépatotoxiques, notamment l'atractyloside et la carboxyatractyloside (Streeter V, 2011).

✓ Atractyloside :

Les études chimiques et pharmacologiques et isolement du principe actif de la racine de *l'atractylis gummifera* ont été réalisés par LEFRANC en 1866, ont donné le premier principe toxique appelé l'atractyloside. La formule ainsi que celle de ses dérivés d'hydrolyse sont établies par Wunschendorf et Braudel (Hammiche V et al., 2013).

L'atractyloside est un hétéro glucoside diterpénique à structurer kaurène. Il appelle encore atractylate de potassium ou atractyline (Boutoub O, 2015).

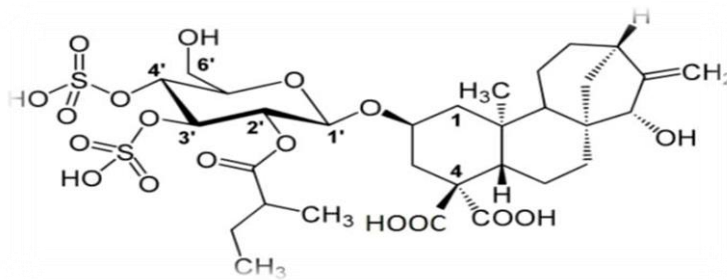


Structure de l'atractyloside (Ahid S et al., 2012)

✓ Carboxyatractyloside :

En 1964, Danieli isola le deuxième principe toxique de la racine de *l'atractylis gummifera* appelé gummiferine ou 4-carboxyatractyloside, c'est un composé voisin de l'atractyloside, mais il en diffère en deux choses : la présence d'un second groupe carboxylique en position C-4 du cycle diterpénique (Daniele C et al., 2005) et la toxicité beaucoup plus importante.

Il y a beaucoup des plantes qui contiennent du carboxyatractyloside comprennent *Iphiona aucheri* et *Wedelia asperima* (Ahid S et al., 2012).



Structure du carboxyatractyloside (Ahid S et al., 2012)

Polyphénols :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires (Bruneton J, 2015) présentes dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fruits et fleurs (Boizot N, 2006).

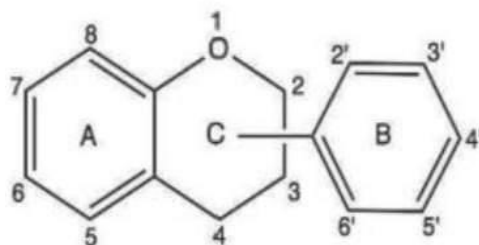
Les principales classes de polyphénols présentes chez *l'atractylis gummifera* sont les flavonoïdes, les tanins et les anthocyanes (Khadhri A, 2013).

✓ Flavonoïdes :

Flavonoïdes sont des pigments végétaux responsables des colorations rouge, orange et jaune de différentes parties végétales (Ghedira K, 2005).

Tous les flavonoïdes ont la même structure de base (C6-C3-C6). Dans leur structure de base, ils contiennent quinze atomes de carbone : une unité C à trois atomes de carbone lié avec deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbone (Boubekri Ch, 2014).

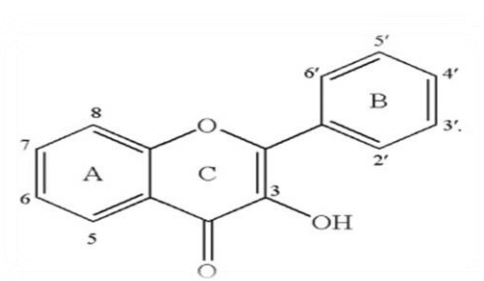
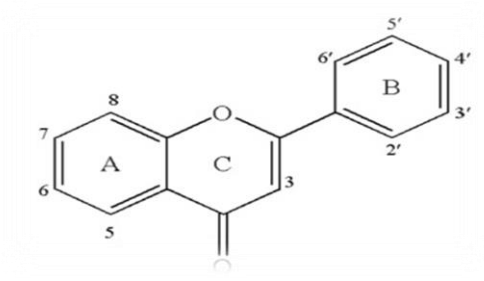
Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes mais principalement les flavones, les flavanols (El Fennouni M., 2012) et les anthocyanes (Khadhri A, 2013) qui sont présents dans la plante *Atractylis gummifera*.



Structure de base des flavonoïdes (Càkova V, 2013).

Flavones et flavonols :

Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (Fraga C, 2009).



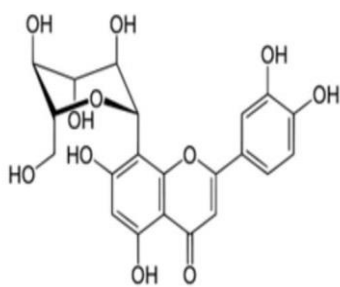
Structure générale des flavones

(Bruneton J, 2009)

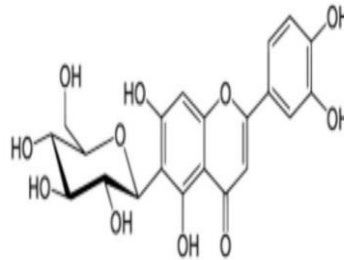
Structure générale des flavonols

(Bruneton J, 2009)

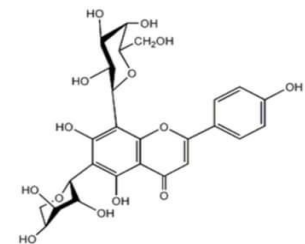
Les principales flavones trouvées dans *l'atractylis gummifera* sont : L'orientine, l'homo-orientine, le corymboside, le néocorymboside et l'isoschaftoside (Hammiche V et al., 2013).



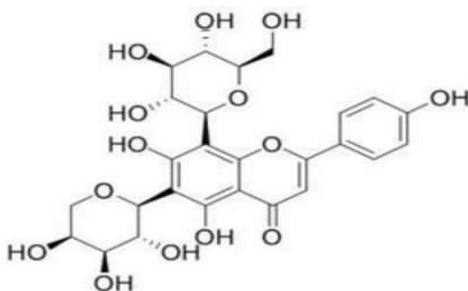
Orientine



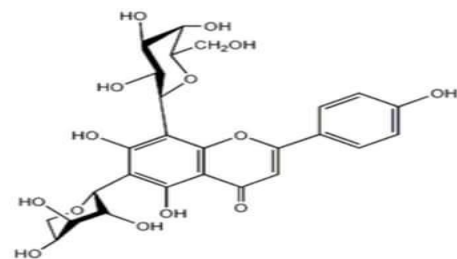
Homo-orientine



Corymboside



Isoschaftoside



Néocorymboside

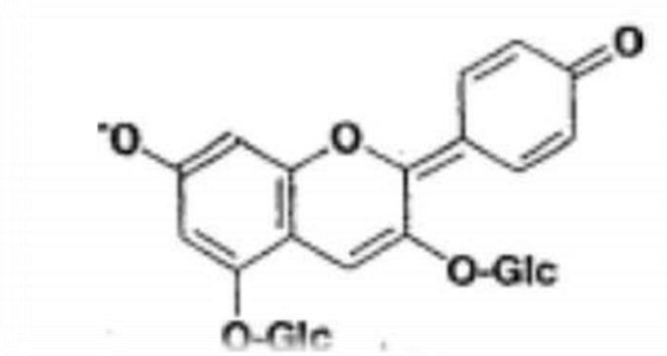
flavones présentes chez *l'Atractylis gummifera* (Benbouziane FZ, 2016)

Anthocyanes :

Les anthocyanes sont des éléments phénoliques responsables de couleur de nombreux fruits, fleurs et baies. Leurs dérivés glycosylés et polyhydroxylés. Sont des pigments responsables de la coloration rouge, bleue, violette ou rose (Bruneton J, 2009).

La responsable de la coloration des racines de *Atractylis gummifera*, c'est : les anthocyanes (Khadhri A, 2013).

Leur structure de base contient un noyau "flavone" glucosylé en position C3 (Bruneton J, 2009).

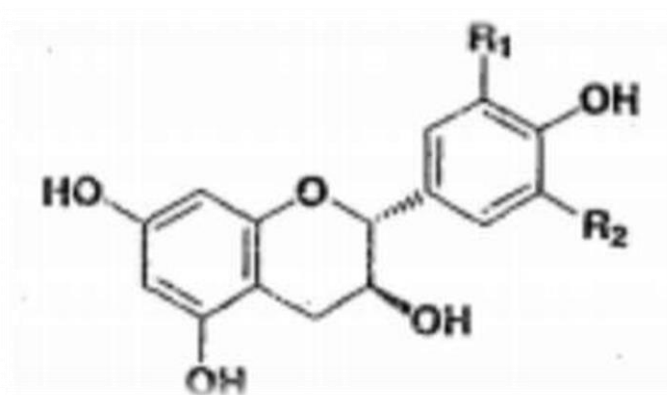


Structure des anthocyanosides (Bruneton J, 2009).

✓ Les tanins :

Les tanins sont des composés polyphénoliques de structures variées, Il y a deux types : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. (Boubekri CH., 2014). Le type de tanins qui sont présente chez *Atractylis gummifera* c'est : les tanins condensés (Benbouziane F, 2016).

Les tanins condensés sont des polymères flavaniques. Ils sont composés d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Bruneton J, 2009).



Structure de base des tannins condensés (Bruneton J, 2009).

I-6 Usage en Algérie :

I-6-1 Usage traditionnels :

La recherche ethnobotanique n'a pas documenté l'utilisation d'*Addad* et les racines séchées peuvent être trouvées chez des herboristes vendant du latex desséché. Bien qu'il soit encore largement utilisé en Algérie et au Maroc, il n'est plus utilisé en Tunisie de manière traditionnelle (Boukef MK, 1986).

Racines :

Pour un usage interne : les racines desséchées sont utilisées après une longue cuisson dans l'eau, pour arrêter les saignements, faciliter l'accouchement, guérir l'œdème, l'épilepsie et provoquent des vomissements. Elle est utilisée comme stupéfiant et pour traiter la schizophrénie (Bellakhdar J, 1997).

Par fumigation, elle soulage les accouchements difficiles et soigne les rhumes, les vertiges, les céphalées et les paralysies (Bellakhdar J 1997).

Pour un usage externe : les racines cuites à l'eau ou la poudre sont utilisées localement pour les lésions cutanées syphilitiques, les abcès et les furoncles (Merad R, 1973). La gale, les taches de rousseur et les boutons d'acné sont traités avec des frottements et des compresses (Bellakhdar J, 1997).

Par fumigation, les morceaux de racines sont utilisés comme pesticides dans tout le Maghreb et se retrouvent dans de nombreux rituels magiques destinés à invoquer les djinns et les mauvais esprits (Hammiche V et al., 2013).

I-6-2 Usage criminels :

L'emploi de *Atractylis gummifera* pour se suicider ou à des fins criminels entraîne des accidents catastrophiques et mortels (El fenouni M, 2012).

En cas d'intoxication criminelle, la poudre de racine ou de préférence le suc de racine frais est le plus souvent servi dans le couscous, la soupe, le lait ou le café (Ait Youssef M, 2006). La plante est placée seule ou combinée avec d'autres toxines, en particulier l'arsenic et la jusquiame blanche, cette plante antiémétique est souvent ajoutée pour empêcher la victime de rejeter le poison dans les vomissements (Hammiche V et al., 2013).

Dans la grande majorité des cas, l'intoxication criminelle par le chardon à glu est basée sur des pronostics fâcheux. Les problèmes médico-légaux sont causés par le manque de sensibilisation des cliniciens pour cette plante et leur évolution rapide. Les autopsies pourraient trouver leur solution, ce n'est qu'à travers la démonstration de l'agent responsable l'attractyloside (Hammiche V et al., 2013).

I-7 Partie et principe toxique :

Les principes toxiques existent dans tous les organes de *l'A-gummifera*. Les parties aériennes (la tige, les bractées, la fleur, la graine et la feuille) considérées moins toxiques et la partie souterraine (racine) est la plus toxiques. Il y a deux glucosides responsables de la toxicité l'atractyloside et le carboxyatractylatoside. Ce dernier le plus toxique que l'autre (Hammiche V et *al.*, 2013).

I-8 Mode d'action toxique :

Les deux glycosides (atractyloside et carboxyatractyloside) empêchent la phosphorylation oxydative, en raison d'analogie structurale entre l'ADP et l'atractyloside, ce dernier entre en compétition avec l'ADP et se fixe sur l'enzyme adénine nucléotide translocase qui responsable à transfert de l'ADP dans la matrice mitochondriale et de sa transformation en ATP. Et la substance carboxyatractyloside inhibe la transformation de l'ADP en ATP.

Ces glycosides sont des inhibiteurs de la Chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, l'Inhibition de la translocase par une seule de ces toxiques inhibe toute la chaîne respiratoire. L'action des deux hétérosides provoque une augmentation de la consommation du glucose et un épuisement des stocks hépatique et musculaire en glycogène. (Hammiche V et *al.*, 2013).

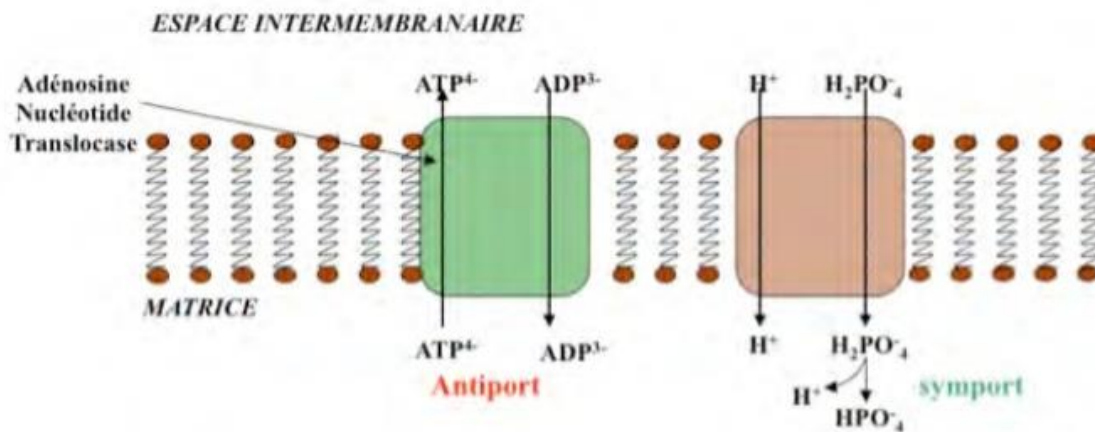


Figure n° 10: Echange ATP/ADP à travers la membrane mitochondriale

(Megueddem et Djafer, 2002)

II Génotoxicité

II-1 Définition de génotoxicité :

La toxicologie génétique est la discipline qui cherche à détecter les facteurs chimiques ou physiques qui interagissent (directement ou indirectement) avec l'ADN des cellules somatiques et/ou germinales, qui, s'ils ne sont pas fidèlement réparés, peuvent conduire à des mutations génétiques et/ou chromosomiques. (Thybaud et *al.*, 2007).

Lorsqu'elles se produisent sur des cellules somatiques, ces altérations et altérations chromosomiques ont le potentiel de déclencher un processus cancérigène. En cas d'endommagement des cellules germinales, l'effet génotoxique pourrait entraîner une toxicité pour la reproduction (reprotoxicité) et/ou un risque théorique de transmission des mutations à la génération suivante. (Meek et *al.*, 2003).

II-2 Les tests de génotoxicité :

II-2.1. Test de comète :

Le test de comètes est également appelé « électrophorèse sur gel unicellulaire » ou SCGE. a été décrite par (Ostling et Johanson, 1984). Le test est simple, peu coûteux et très sensible. C'est un outil important pour étudier la génotoxicité d'un ou plusieurs produits chimiques sur tout tissu vivant constitué de cellules eucaryotes au niveau cellulaire. (Cotelle, 2018 ; Foltete, 2018) Cela permet l'évaluation des cassures d'AND simple et double brin et des sites alcalino- labiles dans des cellules eucaryotes individuelles *in vitro* (McKelvey-Martin et *al.*, 1993).

La technique fonctionne en suspendant des cellules dans un gel d'agarose sur lame de microscope, suivi d'une étape de lyse cellulaire et relâchez les noyaux qui vont migrer dans le champ électrophorétique

Si l'ADN est intact (reste super enroulé) et révélé, il a la forme d'une sphère compacte.

Si l'AND est endommagé, les noyaux brisés apparaissent comme comète (Soughir, 2009).

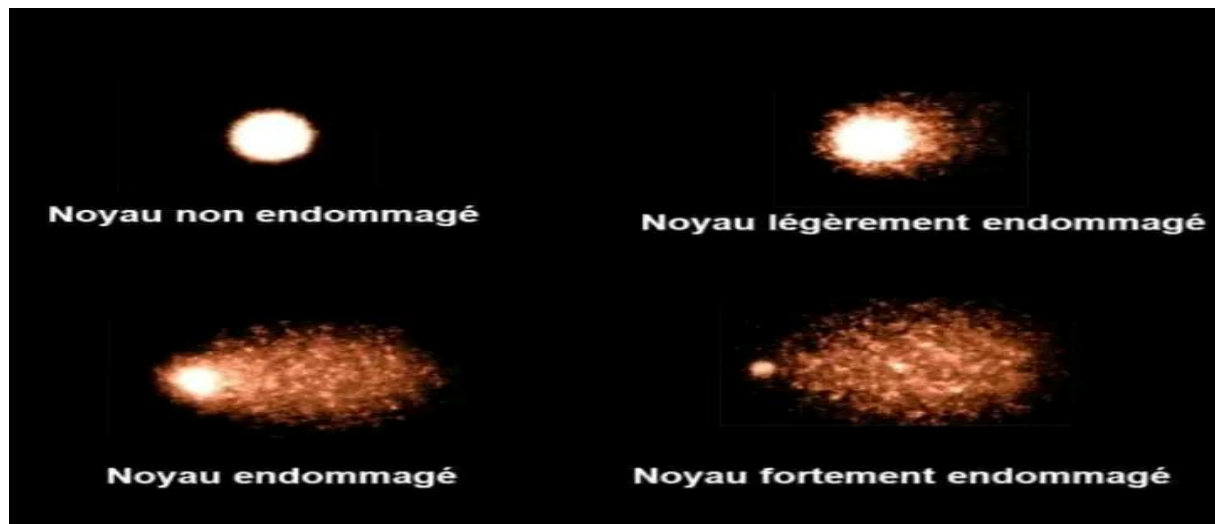


Figure n° 11 : Aspect des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation

De l'ADN (Moche, 2014)

II-4.2 Test des aberrations chromosomiques (AC) :

L'aberration chromosomique est une méthode cytogénétique classique qui détecte les dommages chromosomiques causés par divers produits chimiques tels que les analogues de base, les agents alkylants et les agents intercalants. Le dommage ultime qui cause des aberrations est une rupture de brin d'AND (Palitti 1998 ; Somorovska et *al.*, 1999).

Le test est un biomarqueur à effet précoce. Ces aberrations chromosomiques peuvent être chromatidiques (échanges, cassures...) ou chromosomiques (affectant les deux chromatides d'un chromosome : fragments acentriques ou dicentriques, translocations...) (Ortege, 2004) Après culture cellulaire, les cellules sont bloquées par la colchicine en métaphase. Par la suite, les cellules rompues sont fixées dans une solution hypotonique et colorées. Ensuite, les anomalies du nombre et de la structure des chromosomes (inversions, anneaux, délétions, lacunes, etc.) sont observées au microscope optique. Ces anomalies résultent de ruptures chromosomiques entières et de réarrangements anormaux ultérieurs. (Pillière F. et Falcy M., 1991).

II- 4-3 Test Echange chromatides sœurs :

Le test d'échange de chromatide sœur (SCE) est un test à court terme qui détecte l'échange d'ADN entre les chromatides sœurs d'un chromosome homologue.

La détection de SCE nécessite des méthodes pour étiqueter de manières différentielles les chromatides sœurs. Ceci peut être réalisé par incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires. Les SCE peuvent être mesurés dans les systèmes mammifères et non mammifères. Cela a été fait en exposant des cellules de mammifères de laboratoire à des produits chimiques testés avec et sans le système d'activation métabolique exogène de mammifère et cultivées dans un milieu contenant du BrdU pendant deux cycle de réplication (Léonard,1990).

II-4-4 Test de micronoyau (MN) :

Le test *In vitro* du micronoyau est un système de test permettant la détection de produits chimiques qui induisent la formation de petits fragments d'AND entourés par une membrane formant les micronoyaux dans le cytoplasme de la cellule. Ces micronoyaux peuvent provenir de fragments acentriques (fragments chromosomiques dépourvus de centromère) ou de chromosomes entiers incapables de migrer avec le reste des chromosomes lors de l'anaphase

La division cellulaire. Le test a donc le potentiel de détecter l'activité des produits chimiques clastogènes et ancogènes (Fenech, 2000).

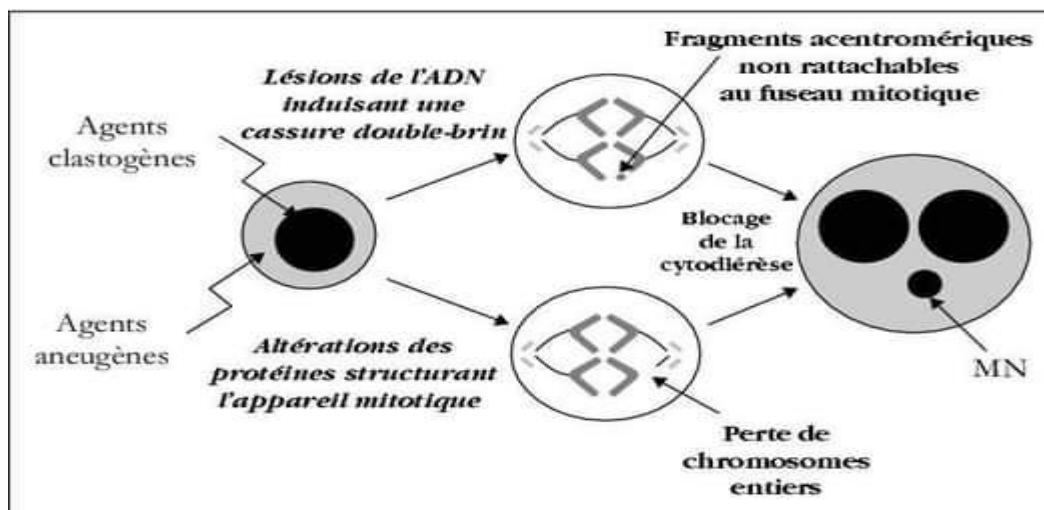


Figure n°12 : Mécanisme de test MN (Larmarcovai et al.,2007)

II-4-5 Test *Allium cepa* :

En 1938 le premier scientifique qui a évalué les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine (Bougherara M et al., 2007). Ensuite, Il a été appliqué sur métaux, Plantes et autres substances organiques.

Allium cepa est un modèle génétique pour la détection des mutagènes dans différents environnements, l'évaluation des polluants environnementaux et de nombreux points génétiques. Permet d'évaluer les dommages par l'observation d'altérations chromosomiques. (Bougherara M et al., 2007)

Les racines d'*Allium cepa* utilisées pour évaluer le nombre d'aberrations chromosomiques. Premièrement, les tests de croissance des racines sont couramment utilisés pour déterminer les valeurs EC50 pour l'allongement des racines. Les échantillons sont ensuite analysés pour les aberrations chromosomiques et/ou les micronoyaux en utilisant la valeur EC50 comme concentration la plus élevée testée. (Feretti D et al., 2007).

Avantage :

✓ Cytologie :	✓ Manipulation :
-Chromosomes longue et large.	- Matériel végétal disponible toute l'année.
- Pourcentage élevé de division cellulaire.	- Facile à cultiver dans les laboratoires.
- Facilité de détection des aberrations chromatiques. (Van Der Meer et al, 1993)	- Coloration

Inconvénients :

- Hautement sensible
- Fournie ce qu'on appelle de faux positifs résultats. (Fiskesjo G, 1993)

III : Les activités biologiques :

III-1 Activité antioxydant :

III-1-1 Le stress oxydant :

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et la capacité de l'organisme à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. (Boyd et *al.*, 2003).

III-1-2 Les radicaux libres :

Un radical libre est une molécule avec un ou plusieurs électrons non apparié (Jacques B, et André R, 2004).

La molécule est très instable et réagit facilement avec d'autres composants pour tenter de capturer les électrons nécessaires au maintien de la stabilité, une réaction en chaîne

commence lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche, en lui privant de ses électrons et que la molécule attaquée devient elle-même un radical libre. (Martinez Cayuela M, 1995).

III-1-3 les antioxydants :

Les antioxydants sont des substances qui peuvent empêcher ou ralentir l'oxydation d'autres molécules (Flora, 2009).

Ces antioxydants se répartissent en deux grandes catégories, endogènes (molécules produites par biosynthèse) et exogènes (vitamines, oligo-éléments ou antioxydants synthétiques) (Thiebault et Sprumont, 2005).

Les antioxydants les plus connus sont le bêta-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), les tocophérols (vitamine E), la quercétine, la rutine et le pycnogénol. La plupart des antioxydants, qu'ils soient synthétiques ou naturels, ont des groupes hydroxyphénols dans leur structure, et certaines de leurs propriétés antioxydantes sont dues au fait que ces composés naturels contiennent des radicaux libres tels que les radicaux hydroxyle (OH) et le superoxyde (O₂) à sa capacité à piéger les radicaux (Antolovich et al., 2002. Burda et Oleszek, 2001)

III-2 L'activité anti-inflammatoire :

III-2-1 Définition de l'Anti-inflammatoire : L'Inflammation est considérée comme facteur de cause ou de conséquence de plusieurs états pathologiques comme les maladies cardiovasculaires (Mariotti, 2011), les cancers ou les maladies neurodégénératives (Zhang et *al.*, 2010).

III-2-2 Les types des activités anti-inflammatoires :

III-2-2-1 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : font partie des médicaments thérapeutiques les plus utilisés dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Actuellement, il existe plus de 50 AINS différents sur le marché dans le monde. Le mécanisme d'action des AINS, élucidé par les travaux de Vane en 1971, repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, une enzyme qui permet la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS entraîne une diminution de la production de prostaglandines (en particulier PGE2 et PGI2), qui sont d'Importants médiateurs de l'Inflammation. (Jean-François N et *al.*, 2001)

III-2-2-2 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou corticoïdes :

Les agents stéroïdiens sont des précurseurs de la cortisone, naturellement sécrétés par les glandes surrénales (Muster, 2005), agissant selon le mécanisme suivant :

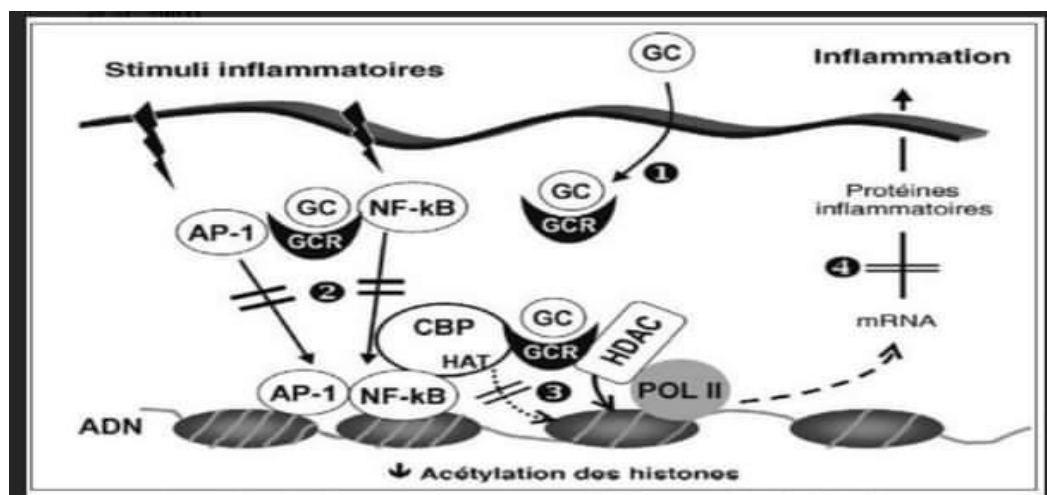


Figure n° 13: Mécanisme d'action des AIS (Devillier,2004)

III-2-2-3 Les anti-inflammatoires d'origine végétale (Naturel) :

Le nombre de composés phytochimiques trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Ils agissent en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes. (Barnes, 1998).

III-3 Activité antibactérienne :

Les bactéries sont organisme procaryotes de diamètre inférieur à 1µm (M Boudjouref, 2011). Leur forme peut être Sphérique (cocci), incurvée (vibrions), bâtonnet (bacilles) ou spiralée (spirochètes) (Nauciel C et Vildé J., 2005).

L'activité antibactérienne est une activité d'une molécule ou un composé présent au sein D'un végétal, Inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité bactérienne aux antimicrobiens varie selon le type d'antimicrobien (Nicolase M et Daniel C, 1998).

L'activité antibactérienne est mesurée par la méthode. Le principe de cette méthode repose sur l'inhibition de la croissance des micro-organismes à après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible.

L'effet des produits antimicrobiens sur les cibles est évalué en mesurant les zones D'inhibition. Selon le diamètre d'inhibition la souche sera classée comme résistante (-) pour les diamètres moins de 8 mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm (Himed L et *al.*, 2014).



TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

1-Collection des plantes :

La plante étudiée (*Atractylis gummifera* L) a été récoltée à Coté Ain Abiddans wilaya de constantine le mois février 2023.

La partie aérienne de *A gummifera*, ont été nettoyées et séchées à l'arbi de l'humidité de la lumière du soleil pendant une semaine, puis séchées dans une étuve à 30°C pendant 24h.

Une fois séchées, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

2-Préparation de l'extrait :

Pour l'extraction mettre 180g de la poudre de la plante avec 3L d'eau distillé met sur un agitateur pendant 1h , puis filtrés 3 fois successif jusqu'à obtenir de extrait aqueux sec .



Figure n° 14 : Préparation d'extrait

3. Test de cytotoxicité et de génotoxicité sur *Allium cepa* :

L'extrait aqueux de *Atractylis gummifera* (EAAG) est utilisé dans ce test. Six concentrations préparées dans de l'eau synthétique (ES) sont utilisées (2-12) mg/ml. L'ES est utilisée ultérieurement comme contrôle négatif dans le test *d'Allium cepa*. (La figure 16) résume les différentes étapes du test *d'Allium cepa*.

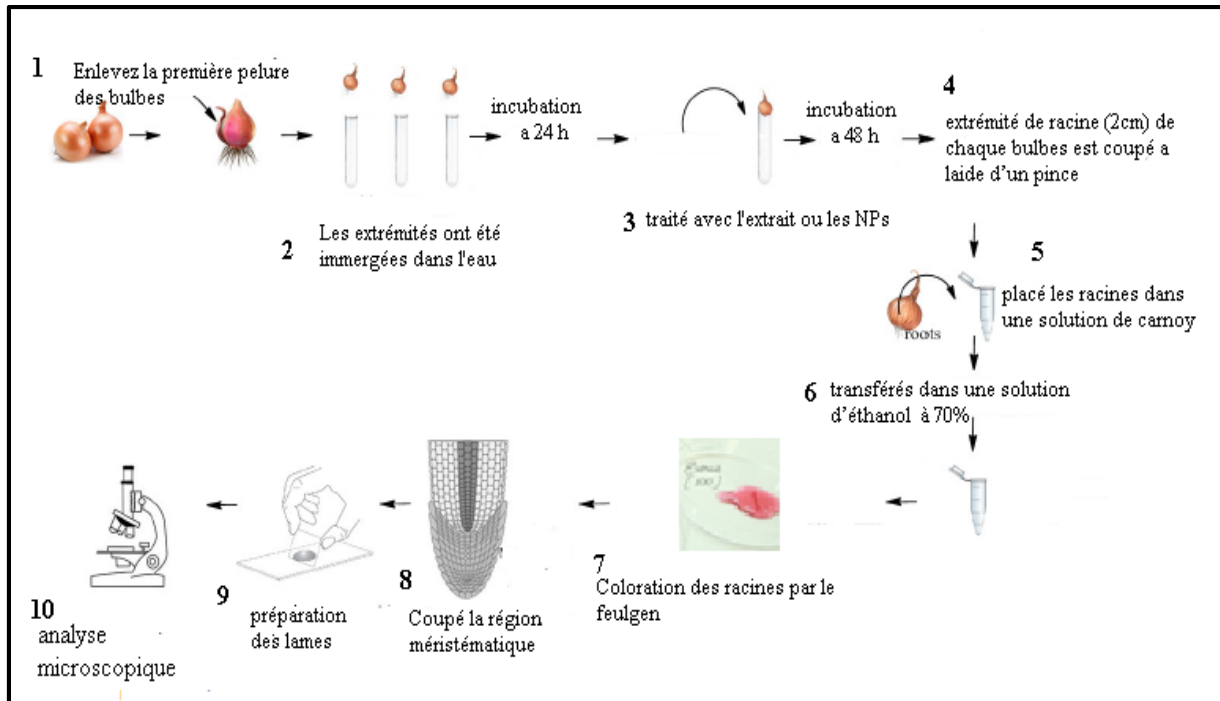


Figure 15 : les étapes expérimentales de test *d'allium cepa* .

Avant l'utilisation des bulbes d'oignon ont été traités comme suit :

- Enlevez la première pelure des bulbes et couper les racines pour permettre au bulbe de pousser des nouvelles racines.
- Rincer les bouts des bulbes avec de l'eau distillée.

Les extrémités des bulbes ont été immergées dans des pots contenant de l'eau synthétique et mise en culture pendant 48 h (Figure 15) dans des conditions sombres dans une chambre fermée à 25° C et l'approvisionnement en eau a été renouvelé toutes les 24 heures.

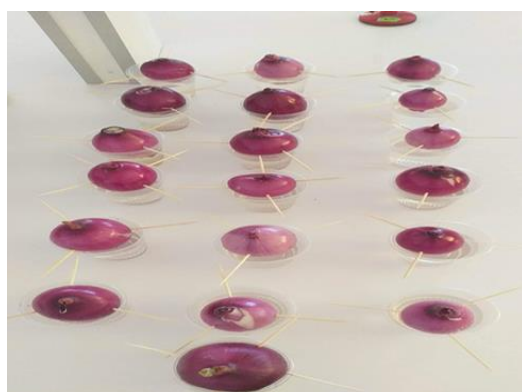


Figure 16: Bulbes d'*Allium cepa* en culture

On commence l'essai quand les racines émergentes atteignent 1.5 à 2 cm de longueur.



Figure 17: Les bulbes de l'*Allium cepa* avec de nouvelles racines

Evaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité :

Pour chaque échantillon testé (ES, EAAG), une série de 5 bulbes est utilisée pour chaque concentration et pour le contrôle négatif (ES). On considérant donc un total de 35 bulbes, il s'agit de placer les bulbes germés sur des pots contenant les différents échantillons à tester pendant 48 heures. Les solutions des échantillons sont renouvelées chaque 24 h et les longueurs des racines sont prises avant et après le traitement. L'apparence des racines est aussi notée à la fin du traitement.

Détermination d'inhibition de l'élongation racinaire et la CE50

Après avoir mesuré la longueur des racines, la moyenne de la longueur des racines traitées et contrôles sont représentées en fonction du pourcentage d'inhibition de l'élongation racinaire et les différentes concentrations des échantillons testés. La concentration produisant

50% d'inhibition de la croissance des racines relativement au contrôle est calculée et exprimée comme étant CE50. (Fiskesjö., 1985).

Détermination de l'indice mitotique (IM), des phases mitotiques (PM) et des aberrations chromosomiques

Fixation des racines :

Après 48 h, pour chaque oignon, 5 racines sont récupérées et fixées dans le mélange (éthanol/acide acétique, (3/1)) pendant 24 h, puis transférées à des tubes contenant l'éthanol 70% et conservées à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

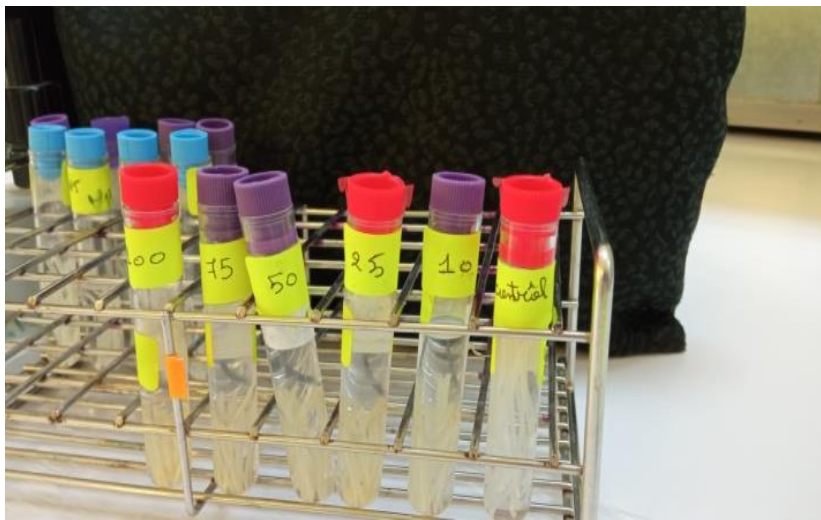


Figure 18 : photographie de la fixation des racines dans le Carnoy

Préparation des lames pour la lecture microscopique

Pour la préparation des lames, les racines sont hydrolysées dans l'HCl 1N à 60°C pendant 8 min. Les racines sont colorées avec le réactif de feulgene (Figure 19). Ensuite, les pointes des racines sont bien écrasées et placées sur des lames avec une goutte d'acide acétique à 45%, puis couvert avec des lamelles. Les lames sont scellées avec du vernis transparent pour la conservation (Yuet et al., 2012).

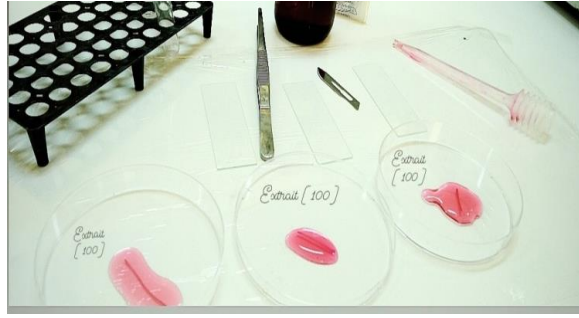


Figure 19: photographie de la coloration des extrémités des racines.

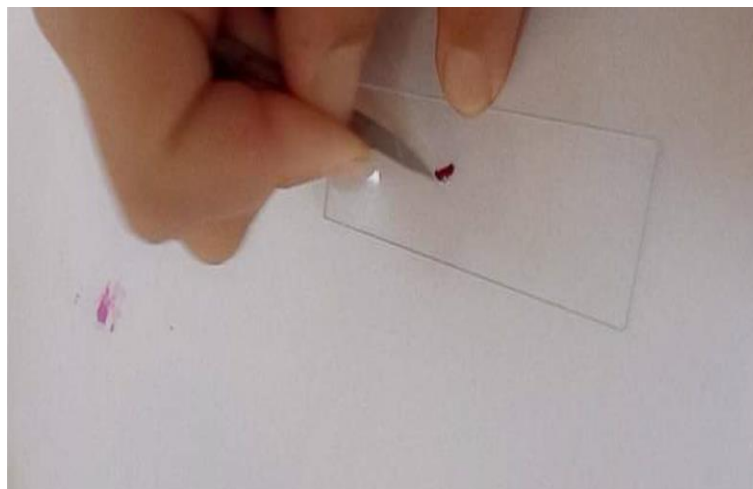


Figure n°20 : Ecrasement des pointes racinaires sur la lame

Examen microscopique :

Les lames sont codées et examinés au microscope optique. L'observation est faite au grossissement 40X avec l'objectif 60X pour les aberrations chromosomique. L'indice mitotique (IM) a été déterminé à partir de l'examen de 500 cellules par concentration à raison de 100 cellules par oignon.

L'indice mitotique a été exprimé en terme de cellules divisées / total de cellules selon la formule suivante (Tedesco et Laughinghouse, 2012):

$$\text{Indice mitotique} = \frac{\text{Pro +Met+ Ana +Tél}}{\text{Nombre total de cellule}}$$

Pour les aberrations chromosomiques, un total de 100 cellules a été examiné par chaque dose. Les catégories suivantes d'aberrations ont été étudiées: fragments chromosomiques, c-mitose, pont, perte de chromosome, et autres aberrations.

Analyse statistique :

Les résultats obtenus pour les échantillons testés (EAZC, CuNP1 et CuNP2) sont comparés à ceux du contrôle négatif (ES) en utilisant le test de Student. Les valeurs obtenues sont considérées significatives si $P \leq 0,05$.

4-Etude de l'activité antioxydante par le test de DPPH :

Principe :

Le test DPPH repose sur la théorie qu'un donneur d'hydrogène est un Antioxydant. Le radical DPPH•, de couleur violette et qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm, accepte l'hydrogène qui est cédé par l'antioxydant pour former le DPPH (Figure21). L'effet de l'antioxydant est proportionnel à la disparition du radical DPPH• et à la décoloration de la solution du violet au jaune (Michel ,2011)

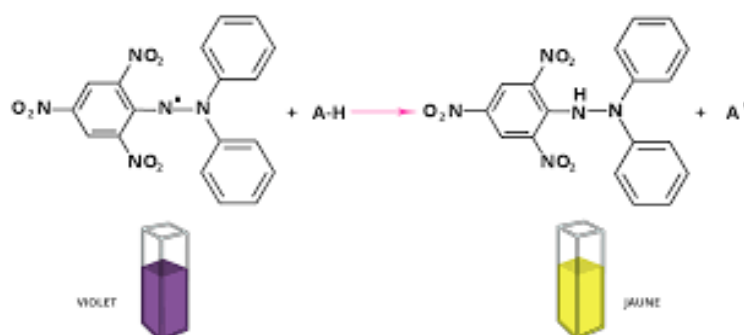


Figure 21 : réaction entre le DPPH• et le composé antioxydant pour former le DPPH(Michel,2011)

Mode opératoire :

L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été réalisée selon la méthodologie décrite par Brand-Williams. Les échantillons ont été mis à réagir avec le radical DPPH stable dans une solution d'éthanol. Le mélange réactionnel consistait à ajouter 0,5 ml des différentes concentrations de (EAZG) et l'extrait méthanolique de l'AG (EMAG) et 3 ml d'éthanol absolu et 0,3 ml de la solution du radical du DPPH (0,5 mM dans l'éthanol). Lorsque le DPPH réagit avec un composé antioxydant, qui peut donner de l'hydrogène, il est réduit. Après une période

d'incubation de 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH Par l'acide ascorbique a été également analysée.

Trois mesures de l'absorbance ont été effectuées pour chaque concentration testée des différents échantillons (n=3).

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire, selon la formule suivante (Lairini *et al.*, 2014) :

$$I \% = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC50) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

5-Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* :

5-1Test d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines :

Principe:

Afin d'évaluer l'activité anti inflammatoire de l'EAAG et l'EMAG, nous avons appliqué le test d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines décrit par (Kandikattu, 2013) avec de légères modifications. Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA, provoquée par la chaleur 72°C.

Mode opératoire :

Dans ce test, 1 ml de chaque concentration a été ajouté à 1 ml de solution de BSA 0.2 % préparé dans le Tris HCL pH : 6,6. Le mélange est ensuite incubé à 37 C° pendant 15 min. Puis dans un bain marie à 72 °C pendant 5 min. À la fin de l'incubation, et après l'avoir vortexer, le mélange est refroidi rapidement, puis la turbidité est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Puis son absorbance est mesurée à 660 nm. Pour chaque concentration d'un échantillon, un blanc constitué de 1 ml d'échantillon et de 1 ml de Tris- HC l (0,05 M à pH 6,6) est préparé. Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait et du Tris-Hel des résultats obtenus.

Dans ce test, le diclofenac (50 µg/ml) a été utilisée comme anti-inflammatoire de référence. L'évaluation de son activité anti-inflammatoire a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que celles appliquées aux échantillons.

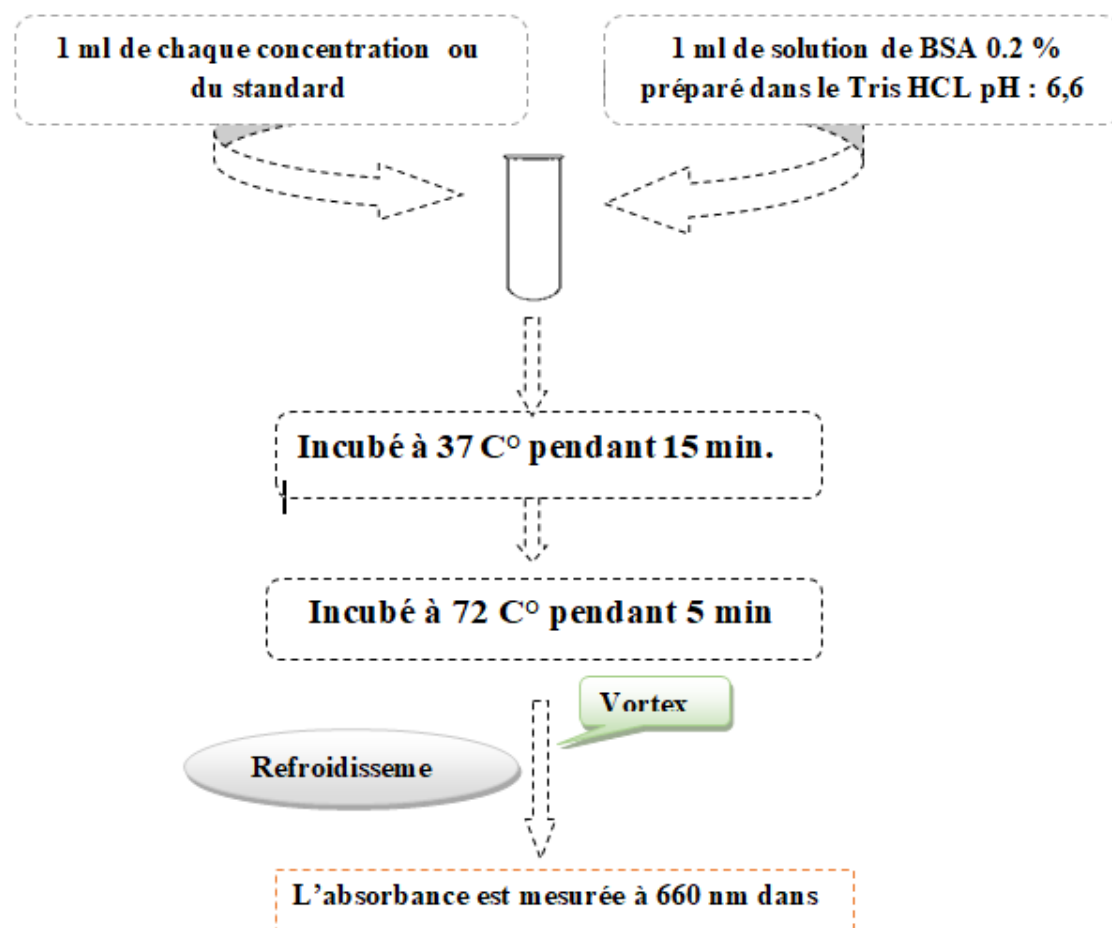


Figure 22: protocole du test d'inhibition de la dénaturation thermique du BSA.

5-2 Test de l'effet hémolytique (test d'innocuité) vis-à-vis des globules rouges:

Avant d'étudier les propriétés stabilisatrices de la membrane des extraits, il est nécessaire d'effectuer des tests de sécurité sur les globules rouges pour déterminer les concentrations à utiliser.

Préparation de la suspension des globules rouges :

Mettre les globules rouges dans un tube et le remplir de solution du PBS saline (Ph = 7,4). Centrifuger le tube (pour obtenir un surnageant limpide et un culot globulaire bien défini). Retirer le surnageant et répéter 3 fois. Après le dernier retrait de surnageant, remettre les globules rouges en suspension dans une solution saline normale jusqu'à l'obtention d'une suspension de globules rouges à 10 %.

Mode opératoire:

Pour ce test, une gamme de concentrations de l'EAAG et l'EMAG a été préparée dans du tampon phosphate salin (pH 7,4). 800 µl des différentes concentrations ont été mélangées avec 200 µl de la suspension de globules rouges à 10%. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 min, puis centrifugé à 1300 g pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été lu à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. Le Diclofénac est utilisé comme molécule de référence dans cette expérience.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, un contrôle incluant 200 µl. de la suspension de globules rouges et 800 µL d'eau physiologique ou de l'eau distillée, à la place de l'extrait, a été préparé pour vérifier l'état des globules rouges ou le 100% d'hémolyse, respectivement.

- Contrôle négatif : 200 µl de la suspension de globules rouges et 800 µL d'eau distillé
- Contrôle positif : 200 µl de la suspension de globules rouges et 800µL d'eau physiologique

Pour chaque concentration des échantillons testés, un blanc constitué de 0,8 ml d'extrait et de 0,2 ml de tampon phosphate salin (PBS pH 7,5) est préparé. Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait et du PBS des résultats obtenues.

$$\text{Pourcentage d'hémolyse (\%)} = [\text{DoE} - \text{D c-} / \text{Doc+}] \times 100$$

DoE: Densité optique de l'échantillon

Doc- : Densité du contrôle négatif

Doc+ : Densité du contrôle positif.

5-3 Dosage de l'MDA :

Principe :

L'objectif du dosage de l'MDA est d'évaluer la peroxydation lipidique, principalement du malondialdéhyde, au niveau des globules rouges exposés aux échantillons testés.

Mode opératoire :

Dans notre étude, le taux de l'MDA a été évalué selon la méthode d'OHKAWA et al. (1979). 0,5 ml de l'homogénat est ajouté à 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA20 %) et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA0, 67%). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 18 min, puis refroidi et 4 ml de n- butanol est ajouté et vortexé. Après centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tr/min, la densité optique du surnageant est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm. La quantité de MDA dans l'échantillon est exprimée en nanomètres/ml d'échantillon. Il est obtenu grâce à une courbe étalon réalisée avec du 1, 1, 3,3-tétractoxypropane dans les mêmes conditions.

6-Activité antibactérienne :

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet antibactérien *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Souches bactériennes utilisées :

Trois souches bactériennes ont été testées : *Escherichia Coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, provenant du laboratoire de Constantine 1.

Stérilisation des matériels :

Les tubes à essai utilisées dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier whatman ont été stérilisés dans l'autoclave à 121°C pendant 15 min

Milieu de culture :

La poudre (38 g) de milieu de Muller Hinton est introduite dans un flacon de 2 litres puis additionnée de 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé en agitant, puis versé dans les flacons et autoclavé 15 min à 121 °C.

Méthode de diffusion sur disque :**Préparation de culture jeune :**

La gélose de Muller Hinton fondue est coulée dans des boîtes de Pétri de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm, puis les gouttelettes de la suspension bactérienne sont ensemencées par stries, enfin, les boîtes sont incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 24 h.

Préparation de l'inoculum bactérien :

Des colonies bien Isolées, ont été prélevées et mises en culture dans 10 ml de l'eau physiologique, et sa densité optique est mesurée à 600 nm et doit être comprise entre 0,08 – 0,1.

Préparation de l'antibiogramme :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir d'un inoculum bactérien sur la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec la gélose de Mueller-Hinton. Des disques de papier whatman de 6 mm de diamètre, sont préparés et stérilisés. Ils sont ensuite imbibés de différents extraits (EAAG et EMAG) et déposés à la surface de la boîte de Pétri ensemencée. Les antibiotiques de chaque bactérie placés dans le centre de boîte de pétri ensemencée. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, l'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, des différents extraits autour des disques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1-Test *Allium cepa* :

Dans la présente étude, la toxicité et la génotoxicité de la plante *Atractylis gummifera* est évaluée par le test *Allium cepa* en prenant en considération trois paramètres : L'inhibition de l'élongation racinaire pour déterminer la CE50 et l'effet sur l'index mitotique, et l'étude des aberrations chromosomiques.

1.1- Test de cytotoxicité et inhibition de l'élongation racinaire.

L'effet de l'extrait aqueux de *l'A.G* sur l'élongation racinaire est présenté par (le tableau 01). Les résultats montrent une inhibition significative ($p < 0.05$) (dépendante des concentrations testés) de l'élongation racinaire par rapport au contrôle. La concentration efficace CE 50 qui inhibe à 50 % l'élongation racinaire est estimée de 5,84 mg/ml (Figure 23). Les racines noircies ou ayant une couleur marron foncé observées au-delà de 6 mg/ml sont un signe de toxicité sévère.

Tableau n°01 : Effet d'*A.gummifera* sur l'élongation racinaire chez *Allium cepa*.

Concentrations (mg/ml)	Moyenne de l'élongation racinaire (%) + SD*	% Inhibition de l'élongation racinaire (%) + SD*
Contrôle négatif - 96h	100.00 a	0.00 a
2	83.07 ± 11.86 b	16.92 ± 11.01b
4	66.57 ± 18.22 c	33.42 ± 12.10 c
6	44.09 ± 9.93 d	55.91 ± 6.35 d
8	27.02 ± 3.53 e	72.98 ± 1.38 e
10	10.89 ± 8.03 f	89.11 ± 5.16 f
12	9.64 ± 6.31 f	90.36 ± 4.74 f

SD, Déviation Standard. * les moyennes avec la même lettre ne présentent pas une différence significative à 0.05. La comparaison est entre les différentes concentrations et avec le contrôle négatif.

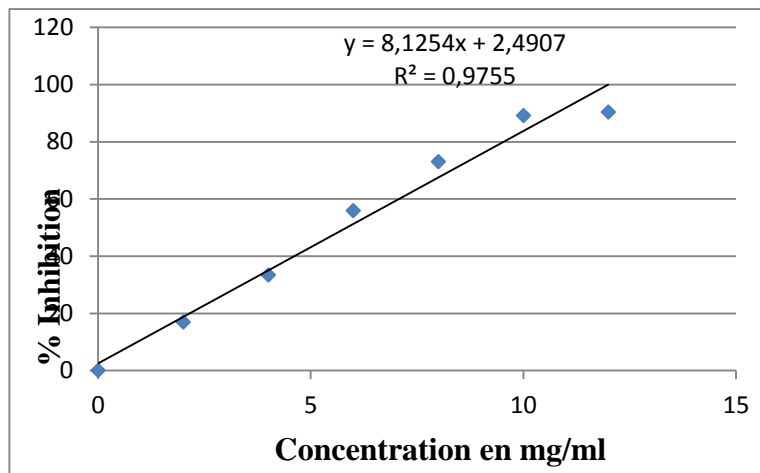


Figure. N°23: Effet inhibiteur des différentes concentrations d'*A. Gummifera* sur l'élongation racinaire d'*Allium cepa*

1.2- Test de génotoxicité

1.2.1- Indice et phases mitotiques

Pour l'étude de génotoxicité, trois concentrations sont choisies en fonction de la valeur EC50 : 3, 6 et 12 mg/ml. Les tableaux 2 et 3. résument respectivement l'effet d'*A. gummifera* sur l'indice mitotique et les phases mitotiques des cellules méristémiques des racines d'*Allium cepa*. L'indice mitotique reflète la fréquence de la division cellulaire et il est considéré comme un paramètre important dans l'évaluation de la toxicité d'une substance en nous renseignant sur la possibilité de l'analyse génotoxicologique, parce qu'un index mitotique inférieur à 10 signifie qu'il n'y a pas suffisamment de cellules en division pour qu'elles soient analysées (Rank. J, 2003). Le pourcentage de l'indice mitotique (IM%) a significativement diminué avec les trois concentrations testées par rapport au groupe témoin et de manière dose-dépendante. Les pourcentages des phases mitotiques indiquent que le pourcentage de phase interphase augmente lorsque MI% diminue et l'accumulation des cellules en interphase est significativement différente dans les trois concentrations testées par rapport au groupe témoin. Concernant les cellules en division, une augmentation significative du pourcentage de prophase a été observée avec des concentrations de 6 et 12 mg/ml par rapport au témoin. Aucune augmentation significative du pourcentage du prophase n'a été observée avec 3 mg/ml.

Tableau 02 : effet d'*A gummifera* sur l'indice mitotique des cellules méristémiques des racines d'*Allium cepa*

Concentrations (mg/ml)	Cellules en division (%) ± SD	Moyenne IM (%) ± SD
Contrôle négatif - 48h	87.74 ± 3.19 a	8.77 ± 0.32 a
3	63.53 ± 6.63 b	6.35 ± 0.66 b
6	43.71 ± 2.48 c	4.37 ± 0.24 c
12	8.67 ± 1.68 d	0.87 ± 0.16 d

SD, Déviation Standard. * les moyennes avec la même lettre ne présentent pas une différence significative à 0.05. La comparaison est entre les différentes concentrations et avec le contrôle négatif.

Tableau 03 : effet d'*A gummifera* sur les phases mitotiques des cellules méristémiques des racines d'*Allium cepa*

Concentrations (mg/ml)	Interphase	Phases Mitotiques (%) ± SD*			
		Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase
Contrôle négatif - 48h	12.26 ± 3.19 a	29.5 ± 1.73 a	24.65 ± 0.92 a	16.76 ± 2.86 a	16.82 ± 2.80 a
3	36.46 ± 6.64 b	30.77 ± 4.74 a	19.07 ± 3.18 b	7.75 ± 1.76 b	6.28 ± 3.12 b
6	56.28 ± 2.48 c	25.60 ± 1.15 b	14.16 ± 2.87 c	2.81 ± 1.68 c	1.12 ± 0.42 c
12	91.33 ± 1.68 d	6.50 ± 0.84 c	1.27 ± 0.73 d	0.70 ± 0.91 c	0.19 ± 0.18 c

SD, Déviation Standard. * les moyennes avec la même lettre ne présentent pas une différence significative à 0.05. La comparaison est entre les différentes concentrations et avec le contrôle négatif.

Selon Leme et Marin-Morales (2009) et Owolarafe et al (2020), l'IM est un paramètre précieux pour déterminer la cytotoxicité d'un agent sur *A. cepa*. Par conséquent, la diminution dose-dépendante observée du l'IM des racines *d'A cepa* traitées avec l'extrait aqueux d'AG est considérée comme un effet cytotoxique qui a conduit à l'inhibition de la croissance des racines. Cela indique un retard du cycle de division cellulaire qui est confirmé par la diminution significative du pourcentage de cellules en division par rapport au contrôle négatif et l'accumulation de cellules en interphase avec les trois concentrations testées d'extrait d'AG. Ces résultats confirment ceux de Sabeen et al. (2020) où l'IM a diminué de manière significative dans les racines *d'A. cepa* exposées à des extraits de légumes sélectionnés. Les observations macroscopiques de la morphologie des cellules des racines *d'A. cepa* ont révélé des racines brunâtres avec des pointes sombres (6 à 12 mg/ml), des racines gonflées et friables et des cassures (10 et 12 mg/ml), ce qui confirme une cytotoxicité sévère sur les racines *d'A. cepa* par l'extrait d'AG à ces concentrations. L'accumulation importante des cellules en interphase et l'augmentation du pourcentage de prophase dans les cellules en division aux concentrations de 6 et 12 mg/ml peuvent s'expliquer par un dysfonctionnement des points de contrôle, ce qui peut entraîner la mort cellulaire (Sabeen et al., 2020). Selon Siddiqui et al. (2007), la consommation d'ATP dans une cellule en division est beaucoup plus élevée que dans une cellule non proliférée, de sorte que la pénurie d'ATP peut être l'une des raisons de la diminution de l'IM. L'effet mitodépresseur et les défauts du cycle cellulaire observés sur les racines *d'A. cepa* exposées à l'AG peuvent être attribués à l'Atractyloside et/ou au Carboxyatractyloside, deux diterpénoides glucosides présents dans l'AG et connus comme inhibiteurs de l'échange d'ATP, bloquant ainsi la phosphorylation oxydative, ce qui empêche davantage la synthèse d'ATP et finalement provoquent la mort cellulaire (Barnum et al., 2014)

1.2.2- Aberrations chromosomiques

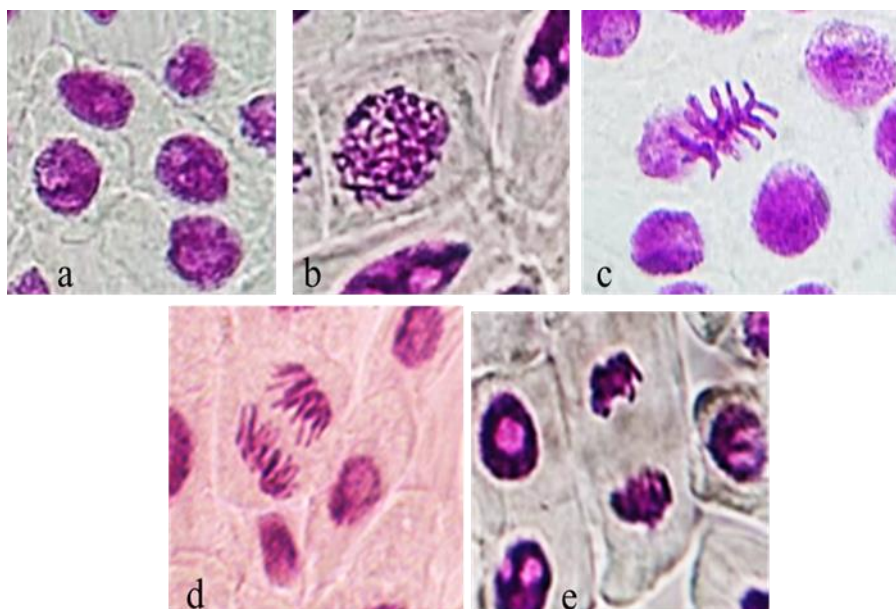
L'effet de l'extrait aqueux *d'A gummifera* sur les aberrations chromosomiques totales (ACT) chez *A. cepa* est présenté dans le tableau 04. Une augmentation dose-dépendante et significative du pourcentage des ATC a été observée dans les concentrations testées par rapport au témoin négatif. La figure 24 montre les différentes phases mitotiques normales chez *Allium cepa* et la figure 25 montre les différentes aberrations chromosomiques et mitotiques observées dans les extrémités des cellules racinaires *d'A cepa* exposé à différentes concentrations de l'extrait aqueux *d'AG*.

Tableau 04 : effet d'*A.gummifera* sur les aberrations chromosomiques totales (ACT) chez

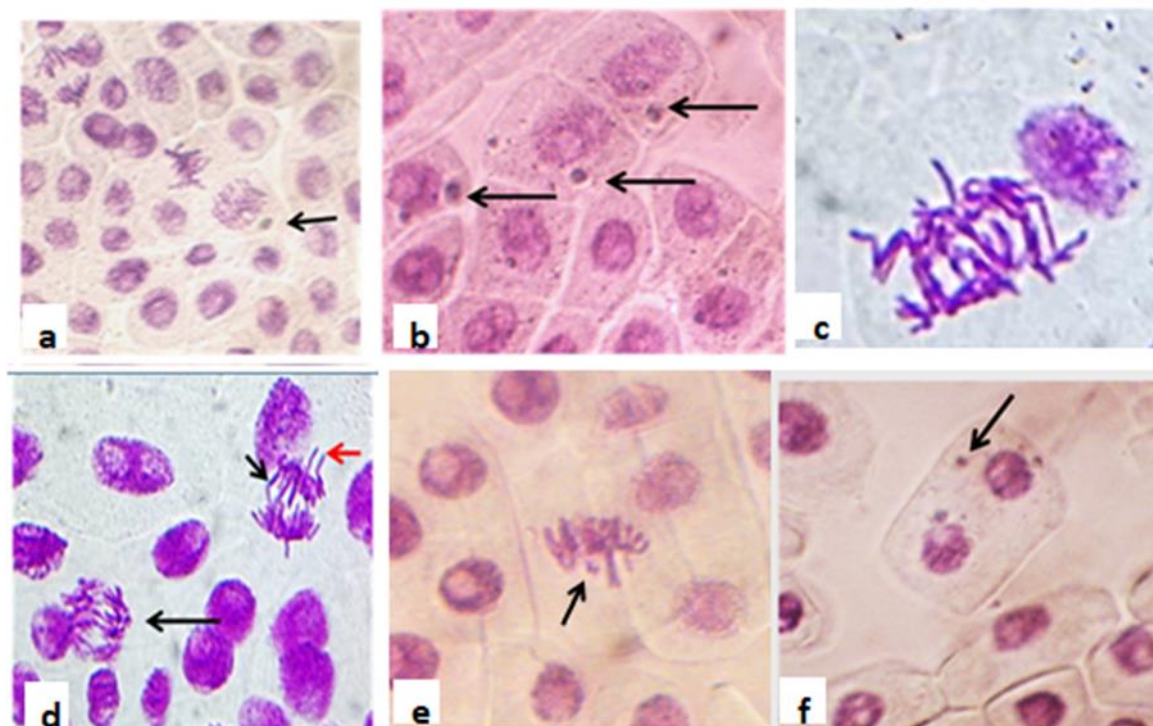
A. cepa

CONCENTRATIONS (MG/ML)	ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES TOTALES (%) ACT % (MOYENNE ± SD)*
CONTROLE NEGATIF - 48H	1.56 ± 0.52a
3	16.6 ± 1.64b
6	37.04 ± 3.02c
12	63.48 ± 4.73d

SD, Déviation Standard. * les moyennes avec la même lettre ne présentent pas une différence significative à 0.05. La comparaison est entre les différentes concentrations et avec le contrôle négatif.



La figure 24 : les différentes phases mitotiques normales chez *Allium cepa* : (a) Interphase, (b) Prophase, (c) Métaphase, (d) Anaphase, (e) Télaphase.



La figure 25 : les différentes aberrations chromosomiques observées dans les extrémités des cellules racinaires *d'A. cepa* exposé à différentes concentrations de l'extrait aqueux *d'AG*

(a) C- métaphase + chromosome vagabond et retardataire en anaphase, (b) micronoyau, (c) C-anaphase + chromosome retardé, (d) ponts (flèche noire) + chromosomes vagabond (flèche rouge), (e) cassures, (f) Cellule binucléée avec des micronoyaux

Pour le test de génotoxicité, les effets clastogènes aneugènes sont évalués. Les aberrations chromosomiques et mitotiques produites par *l'AG* sur les racines *d'A. Cepa* étaient significativement plus élevées dans les trois concentrations testées. Les types d'aberrations chromosomiques les plus fréquemment observés étaient les cassures, les chromosomes collants, C-mitose, les chromosomes retardataires, les micronoyaux et des ponts. Selon Barman et al. (2021), les ponts, le collage et les cassures résultent de dommages à la chromatine. Les ponts résultent de la rupture des chromosomes et/ou des chromatides, de la présence de chromosomes dicentriques ou de la translocation inégale des chromatides. L'adhérence est attribuée à la condensation, à la dépolymérisation de l'ADN chromosomique et à l'enchevêtrement des interactions inter-chromosomiques (Sabeen et al., 2020). Ils sont irréversibles et entraînent la mort cellulaire comme effet hautement toxique (Owolarafe et al., 2020). L'adhérence peut également être causée par la perte de capacités de mouvement des chromosomes. La mitose C est due à une défaillance du fuseau et à un risque accru d'aneuploïdie. Les cassures avec le micronoyau (MN) sont des marqueurs clastogènes et aneugènes. (Owolarafe et al., 2020)

2- L'évaluation de l'activité antioxydante :

Dans cette étude, on a choisi d'évaluer les propriétés antioxydantes in vitro via les deux tests les plus couramment utilisés et de combiner les résultats de ces tests complémentaires afin d'avoir une indication sur la capacité antioxydante des extraits du rhizome d'*A. gummifera*

2-1 Le piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits d'*Atractylis gummifera* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

L'activité antioxydante est évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition du radical DPPH et la détermination de la concentration correspondante à 50% d'inhibition (IC50) des deux extraits (aqueux et méthanolique).

L'EAAG possède une capacité élevée à piéger le radical libre DPPH (Figure 26), avec IC 50% = 4.43 µg/ml contre IC50% = 51,63 µg/ml pour l'EMAG (Tableau 05).

Tableau 05 : Le pouvoir antioxydant in vitro exprimé par IC50 des extraits testés

Echantillons	IC50
Extrait aqueux	4,43mg/ml
Extrait méthanolique	51,63mg/ml

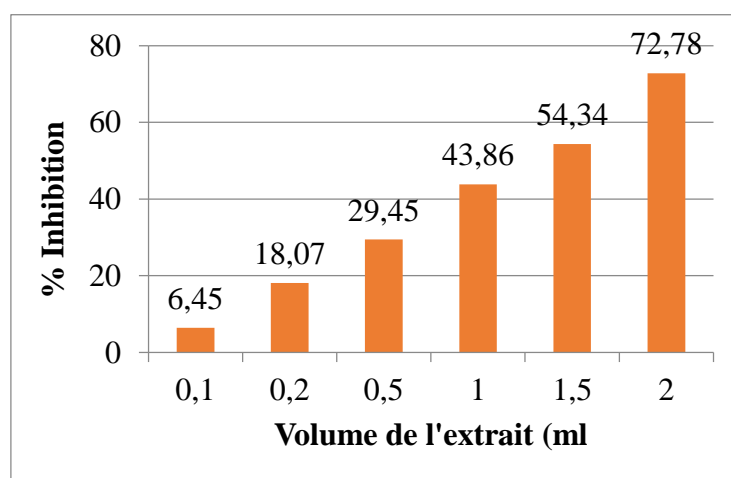


Figure n°26 : Effet scavenger de l'extrait aqueux de *Atractylis gummifera* sur le radical DPPH Ic 50% = 1.29 ml équivalent de 4.43 mg/ml

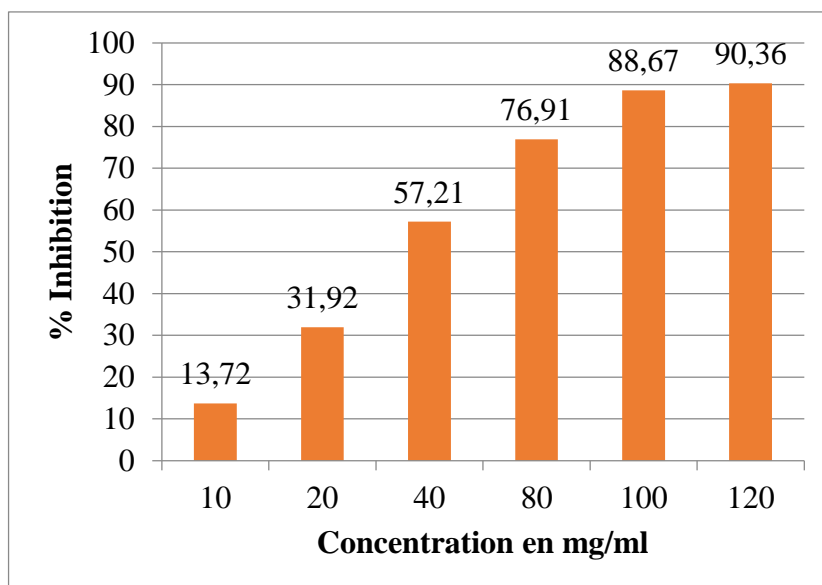


Figure n°27 : Effet scavenger de l'extrait méthanolique de *Atractylis gummifera* sur le radical DPPH IC 50% = 51,63 mg/ml

L'analyse des résultats révèle que l'extrait aqueux possède une IC50 largement inférieure à celle de l'extrait méthanolique. La valeur de IC50 la plus faible correspond à l'activité antioxydante la plus importante. Donc une meilleure activité à l'extrait aqueux.

Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance (Wang et al., 2008). Selon (Khadhri et al., 2013), l'analyse des résultats de l'activité antiradicalaire (DPPH) révèle que la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (CI50) égal 250µg/ml pour l'extrait méthanolique des racine, alors que dans l'extrait traditionnel (aqueux) de la racine, nous pouvons constater que la valeur de IC50 est plus efficace avec une IC50 de 80 µg/ml.

Dans ce test, nous avons utilisé l'acide ascorbique comme standard, les résultats obtenus du pourcentage d'inhibitions sont représentés dans la figure 28. L'acide ascorbique possède un pourcentage d'inhibition dose-dépendante avec une IC50 = 18µg/ml

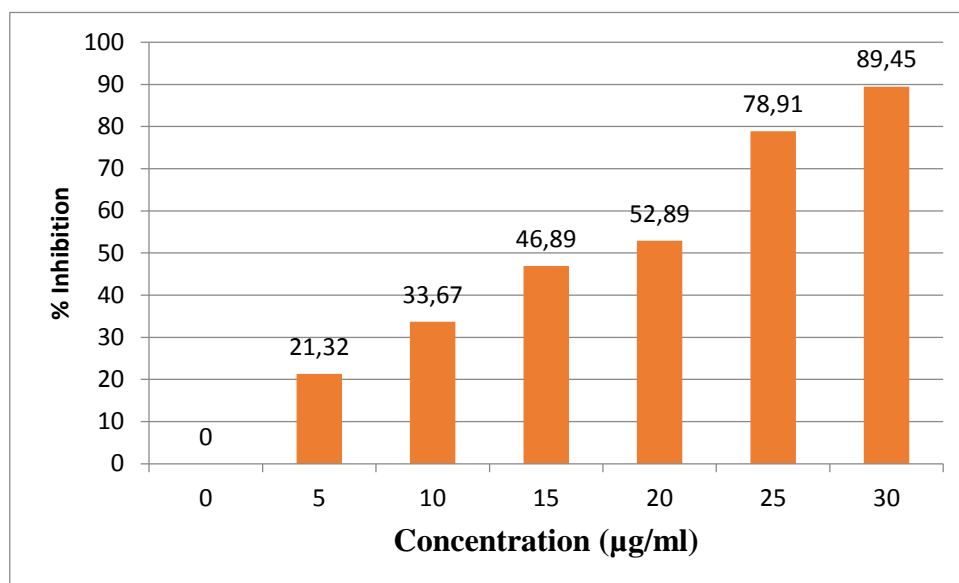


Figure n°28 : Effet scavenger de l'acide ascorbique sur le radical DPPH

IC 50% = 18,43 µg/ml

3- Activité anti-inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire peut être réalisée par deux méthodes ; l'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) et la stabilisation de la membrane érythrocytaire vis-à-vis de l'hémolyse. Ce dernier doit être précédé par un test d'innocuité pour déterminer l'intervalle des concentrations avec un effet hémolytique minimale et pouvant assurer la stabilité membranaire des globules rouges. Le dosage de l'MDA aux concentrations choisies a pour objectif d'estimer le taux d'endommagement de la membrane des globules rouges en fonction de la peroxydation lipidique.

3-1- Test de dénaturation de BSA :

La dénaturation des protéines est l'une des causes de l'inflammation qui conduit à diverses maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire (Ramasubbu K *et al.*, 2023). Le tableau 06 résume les résultats obtenus avec l'EAAG et l'EMAG. Pour l'EAAG, on note une augmentation de l'effet protecteur contre la dénaturation jusqu'à 1 ml, puis l'effet protecteur diminue quand la concentration augmente. La même remarque pour l'EMAG, l'effet protecteur augmente proportionnellement à la concentration jusqu'à 20 mg/ml et se stabilise à 40 mg/ml puis on note la diminution de l'effet protecteur en augmentant la concentration. Cette cinétique de l'effet protecteur contre la dénaturation

thermique du BSA peut être expliquée par l'apparition de l'effet dénaturant exercé par les deux extraits quand leurs concentrations augmentent.

Tableau 06 : Effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* sur contre la dénaturation du BSA

Traitements	Concentrations / Volume	% * d'Inhibition de la dénaturation de BSA
Extrait aqueux AG (ml)	0.5	14.55 ± 0.34
	1	22.33 ± 1.12
	1.5	11.04 ± 2.56
	2	6.23 ± 1.81
Extrait méthanolique AG (mg/ml)	10	12.34 ± 2.33
	20	21.67 ± 1.98
	40	19.65 ± 2.32
	80	11.43 ± 1.77
Diclofénac (µg/ml)	50	79.87 ± 1.12

(*)% Moyenne ± SD (Déviation Standard) avec n= 3

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et l'indométacine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (Sangeetha *et al.*, 2011). Ils empêchent la dénaturation d'albumine traitée par la chaleur à pH physiologique. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération de la structure tridimensionnelle des protéines par la détérioration des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintient cette dernière. Cela signifie que c'est un processus pathologique par lequel ces molécules perdent leur configuration et par conséquent leur fonctionnalité. (Ramasubbu K *et al.*, 2023). Pour le Diclofénac, 50 µg/ml a relevé un pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA de 79,87 %. On peut conclure que les extraits aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* possèdent une faible efficacité anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation des protéines.

L'activité Inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents éléments bioactifs tels que les tannins et les flavonoïdes, mais aussi la présence

de substances toxiques tel que l'atractyloside et le carboxyatractyloside, peut generer un effet dénaturant (Barros L et *al.*, 2008).

3-2 Test d'hémolyse (test d'innocuité) sur les globules rouges

L'étude de l'activité anti-hémolytique ne pouvait se faire sans l'évaluation de l'innocuité des extraits vis-à-vis des cellules érythrocytaires pour déterminer les concentrations à utiliser. Les taux d'hémolyse obtenus après incubation des érythrocytes en présence des différents échantillons testés sont calculés en référence à un témoin positif (GR avec l'eau distillée) et à un témoin négatif. Ces résultats sont récapitulés par le tableau 07

Tableau 07 : Effet hémolytique (test d'innocuité) des extraits aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* sur les globules rouges.

Traitements	Concentrations / Volume	% d'hémolyse (*)
Extrait aqueux AG (ml)	0.5	0.22 ± 0.034
	1	2.81 ± 0.32
	1.5	9.42 ± 1.06
	2	13.5 ± 2.14
Extrait méthanolique AG (mg/ml)	10	3.97 ± 1.71
	20	4.56 ± 0.67
	40	52.33 ± 4.62
	80	72.33 ± 2.01
Diclofénac (µg/ml)	50	5.46 ± 1.55

D'après les résultats du test d'hémolyse, on constate que le pourcentage de l'hémolyse augmente proportionnellement avec l'augmentation des concentrations des deux extraits. Mais de manière plus sévère avec l'extrait méthanolique. C'est résultats indiquent que les deux extraits de AG exerce un effet toxique sur la membrane cytoplasmique des GR.

Contenu hémoglobinique visible à l'œil dans les échantillons sous la forme d'une coloration rouge, Il peut être causé par des facteurs extrinsèques tels une réponse anormale du

système immunitaire et les effets secondaires de certains médicaments (anti inflammatoires non stéroïdes) (Beaumont et Hergaux, 2005. Mintzer et Billet, 2009)

3-3 Test de peroxydation lipidique *in vitro*

Le dosage de l'MDA aux concentrations des échantillons testées a pour objectif d'estimer le taux d'endommagement de la membrane des globules rouges en fonction de la peroxydation lipidique. Les résultats sont présentés dans le tableau 08

Tableau 08 : Effet des extraits aqueux et méthanolique *d'Atractylis gummifera* sur l'MDA dans les globules rouges

Extrait aqueux (ml)	Contrôle	0.5	1	1.5	2
MDA (nmol/ml)*	0.092 ± 0.03	0.019 ± 0.00	0.027 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.074 ± 0.02
Méthanolique (mg/ml)	Contrôle	10	20	40	80
MDA (nmol/ml) *	0.092 ± 0.03	0.036 ± 0.04	0.030 ± 0.02	0.043 ± 0.00	0.065 ± 0.03

(*)% **Moyenne ± SD (Déviation Standard) avec n= 3**

D'après les résultats obtenus, on note que le taux de l'MDA augmente proportionnellement aux concentrations des extraits mais de manière plus intense avec l'EMAG et de la même allure que leur effet hémolytique.

Selon Draper et al. (1988) et Valko et al. (2005), le MDA est l'aldehyde le plus abondant résultant de la peroxydation lipidique. Cet aldehyde peut être considéré comme un indicateur important de la peroxydation lipidique et des dommages cellulaires (Favier, 1997; Bonnefont-Rousselot et al., 2003). Il a été démontré que le malondialdehyde provoque la réticulation et la polymérisation des composants de la membrane et peut contribuer aux effets mutagènes, génotoxique qui sont provoqués par l'altération des mécanismes de défense antioxydant y compris la détoxification et Les enzymes de balayage, ou bien par l'augmentation de la peroxydation lipidique suite à L'interaction entre les Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) et les membranes cellulaires (Attig et al., 2010; Misra et al., 1990).

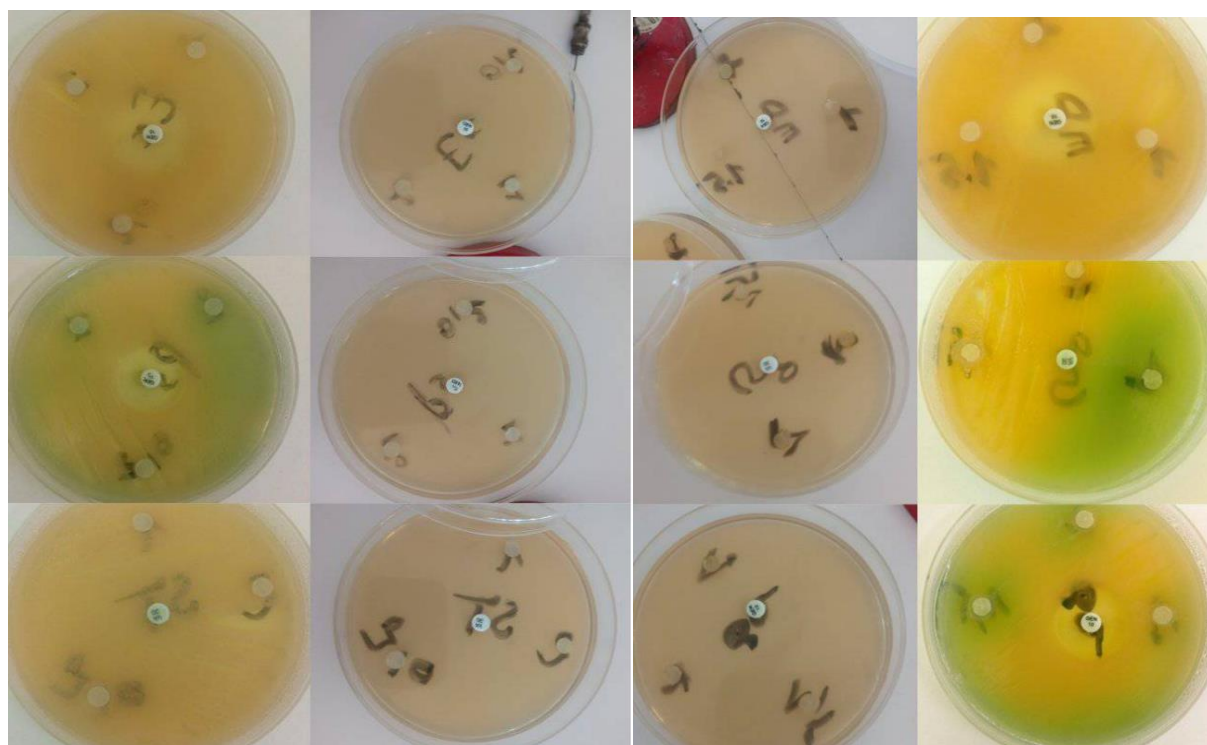
4- L' activité antibactérienne :

L'étude « In vitro » du pouvoir antibactérien des différentes concentrations données

Les deux extraits méthanolique et aqueux de *Atractylis gummifera* ont été testés vis-à-vis trois souches bactériennes via la méthode de diffusion sur disque sur un milieu gélosé solide (Mueller Hinton).

L'activité antibactérienne a été estimée en termes de la zone d'inhibition autour des disques d'antibiotiques (contrôle positif).

Selon les résultats obtenus dans la (figure 29), Les différentes concentrations des deux extraits de AG dans les trois souches ne possèdent pas des zones d'inhibition, c'est à dire aucun effet inhibiteur ou aucune activité antibactérienne n'a été trouvé contre les trois souches étudiées.



extraits Méthanolique	extraits aqueux
-----------------------	-----------------

Figure n°29 : Les résultats de l'activité antibactérienne

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et

les triterpenoides (Rojas et *al.*, 1992). Le pouvoir antimicrobien des extraits des plantes est tributaire de leurs compositions chimiques (Ben Sassi et *al.*, 2007, Naili et *al.*, 2010). Cependant, leurs richesse en composés actifs doués d'activités biologiques ne signifie pas forcément qu'ils auront une activité antibactérienne. Dans une autre étude, *Zygophyllum cornutum* à son tour a été étudiée en terme d'activité antimicrobienne. Le potentiel antimicrobien de deux extraits (Met et Aq) ont été évalué contre quatre espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *klebsiella sp* et *Staphylococcus aureus*) et deux espèces fongiques (*Aspergillus phoenicis* et *Condida sp*). Aucune trace d'activité antimicrobienne ou antifongique n'a été notée sauf avec *Staphylococcus aureus* (Boumaza, 2009, Brantner et *al.*, 1996). Enfin, l'activité antimicrobienne est dépendante des caractères physico-chimiques des composés phytobiotiques et des souches employées (Sari et *al.*, 2006).

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

L'empoisonnement par *Atractylis gummifera* est un problème récurrent dans les pays où la plante est naturellement présente. L'intoxication est difficile à prévenir, car le contact avec la plante est souvent involontaire. Les tests qu'on a utilisé *in vitro* peuvent être utilisés pour prédire ces activités biologiques ainsi que sa toxicité:

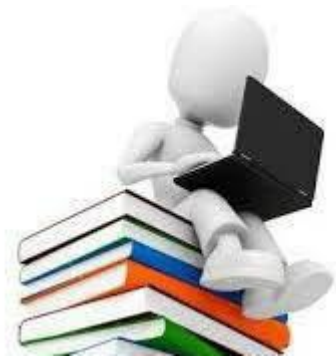
Le potentiel génotoxique d'*Atractylis gummifera* a été déterminé par *Allume cepa* ; les résultats obtenus confirment que la plante est doué des effets toxiques et génotoxique.

L'activité antioxydant des extraits a été évaluée par le test de DPPH *in vitro* ; les résultats obtenus confirment que l'extrait aqueux est doué d'un pouvoir antioxydant plus important que celui de l'extrait méthanolique. Ces propriétés sont probablement liées à la présence de composées phénoliques actifs.

Les tests évaluant l'activité anti-inflammatoire ont montré que *AG* possède un faible effet inhibiteur de la dénaturation des protéines provoquant l'inflammation et montre aussi un effet dénaturant à certaines concentrations. Un effet hémolytique à été aussi enregistré pour les deux extraits de *AG*, accompagné de l'augmentations de la peroxydation lipidique.

L'activité antibactérienne des extraits a été effectuée par la méthode de diffusion sur disque ; Les résultats obtenus ont montré que les extraits aqueux et méthanolique n'ont aucun effet inhibiteur envers les trois souches bactériennes testées.

En perspectives, d'autres études toxicologiques et toxicogénétique doivent être réalisé en utilisant des tests different pour nous renseigner sur le mécanisme de toxicité de *AG* ; ainsi que d'autre études portant sur les différentes activités biologiques doivent être menées.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- 1 .Ahid S., Ait El Cadi M., Meddah B., Cherrah Y. *Atractylis gummifera* L: de l'intoxication aux méthodes analytiques. *Ann Biol Clin* .7 (3): 263-8, (2012).
- 2.Aït Youssef M.(2006) *Plantes médicinales de Kabylie*. Ibis Press. Paris. ISBN: 2-910728- 57 9.
- 3.Antolovich M, Prenzler D, Patsalides E, McDonald,Robards S. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127.Pp183-198.
- 4 .Aouadhi S,(2010) *Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle [Master spécialisé en toxicologie]*. Faculté de médecine de Tunis

B

- .Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira I.C.F.R.(2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem*. 111, 61–66.
- .Bellakhdar J.(1997) *La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Paris. Casablanca: Ibis Press. Editions Le Fennec. 764 p. ISBN: 2-910728-03- X.
- .Benbouziane FZ ,Beneddra M.(2016) *Contribution à une étude botanique et chimique du chardon à glu, Atractylis gummifera* L., famille des Asteraceae [Mémoire]. Tlemcen: Université Abou Bekr Belkaïd, faculté de médecine Dr. B.Benzerdjeb.
- Boizot N, Charpentier J P. (2006) *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier* .Cahier des Techniques de l'INRA, p. 79-82.
- .Boubekri Chérifa.(2014) « Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *solanum melongena* par des techniques électrochimiques ». Université Mohamed Khider- Biskra. Mémoire.
- .Boudjouref M. *Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris* L. Thèse de Magister. Université Ferhat Abbes Sétif., Algérie, 2011.

.Bougherara M, Hamlaoui M, Hamlaoui W.(2007) Etude toxicogénétique du xylène (Test Allium Cepa), mémoire.

.Boukef MK.(1986) Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. ACCT, Paris.

.Boumaza. (2009). Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Toxicologie moléculaire et cellulaire [en ligne]. Université de Constantine. 126p

.Boutoub O.(2015) Validation statistique du Dosage du carboxyatractylatosidedu chardon à glu par spectrophotométrie UV [Licence en Sciences & Techniques]. FÈS: UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH.

.Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B.

(2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. Glycoscience& Nutrition. 4 (6):7.(cited in Mohammedi Z).

.Brantner A., Maleš Ž., Pepeljnjak S., Antolić A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill. (Christ's thorn). Journal of ethnopharmacology [en ligne]. 52(1): 119–122.

.Bruneton J (1) .(2009) Pharmacognosie; Phytochimie; Plantes médicinales 4e éd. Paris: TEC&DOC Editions.

.Bruneton J (2). (2015) Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 5ème édition. Edition Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris, p 1504.

.Burda S, Oleszek W. (2001).Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J. Agric. Food Chem.49 (6), Pp2774-2779.

C

.Čáková V.(2013) Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales: identification des constituants d'*Aerides rosea* et d'*Acampe rigida*: techniques analytiques et préparatives appliquées à *Vanda coerulea* et *Vanda teres* » [Thèse]. Strasbourg.

.Charnot A. La toxicologie au Maroc. Mémoire de la société des Sciences naturelles du Maroc. Emile Larose, 1945.

D

.Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, Sekfali N, Saso N, Mazzanti G. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* [En ligne], 2005;.

E

El Fennouni M.(2012) Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'avortement au Maroc [Thèse Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie.

F

.Feretti D, Zerbini I, Zani C, Ceretti E, moretti M, Monarca S.(2007) *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes.

.Fiskesjo G.(1993) The *Allium cepa* in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water.* 8: 291-298.

.Flora, S. J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*.

.Fraga C.(2009) Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. John Wiley & Sons Edition, p 5-13.

G

.Ghedira, K.(2005) Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle Ppophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3 (4), 162-169.

H

.Hafidi K, (2014) Intoxications par les plantes et les produits de la pharmacopée traditionnelle chez l'enfant [pour l'obtention du doctorat en médecine, FES.

.Hammiche V, Merad R, Azzouz M.(2013) Plantes toxique à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Edition : Springer Verlag Paris.

.Hamouda C, Hédhili A, Ben Salah N, Zhioua M, Amamou M.(2004) A review of acute poisoning from *Atractylis gummifera* L. *Vet Hum Toxicol* ; 46(3): 144-6.

.Himed L.,(2014) Merniz S., Bnbraham M. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limon (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. *Algerian Journal of Natural Products*. Algeria.

J

.Jacques B, and André R. (2004). *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.

K

.Khaldi A., Meddah B., Moussaoui A., Benmehdi H., (2012) Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement in vitro des moisissures. *European Journal of Scientific Research* 80(3): 311-32.

.Khadhri A.(2013) Composés phénoliques et activités antioxydante de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie*, vol. 36, janv.

L

.Larabi A., Azzouz M., Abtroun R., Reggabi M et Alamir B.(2012) Déterminations des teneurs en atractyloside dans les racines d'*Atractylis gummifera* L. provenant de six régions d'Algérie.

.Lefranc E.(1866) Étude botanique, chimique et toxicologique sur l'*Atractylis gummifera* (el Heddad des Arabes). Paris: Librairie Germer-Baillière.

M

.Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*.77: 147-161.

.McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., & Collins, A.(1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): à European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 288(1), 47-63.

.Meek M E, Bucher J, R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKeeman, L. D., Patton, D. E. (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical reviews in toxicology*, 33(6), 591-653.

.Megueddem M., et Djafer R. (2012) Intoxication au chardon à glu. Faculté de médecine d'Annaba, Algérie, Toxicol Clin, 18, pp. 5-10

.Merad R. (1973) Contribution a la connaissance de la Pharmacopée traditionnelle Algérienne. Les éventaires du Grand-Alger. Thèse pour le Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université d'Alger.

.Moche, H. (2014) Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin positif génotoxique nanoparticulaire et étude de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments. Lille 2, France.

N

.Nauciel C, Vildé J.(2005) Bactériologie médicale. 2ème Ed. Masson., Paris.

.Nicolas, M., et Daniel, C. (1998). Activités technologiques en microbiologie-Techniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'Aquitaine-Bordeaux. Cité par Allane.

P

.Palitti F.(1989) Mechanisms of origin of chromosomal aberrations. Mut- at. Res.404, 133–137.

.Pillière F et Falcy M.(1991) Exposition aux produits chimiques génotoxique. Fiche medico-technique. Institut National de recherche et de sécurité, Paris, 330- 336.

S

.Soughir D.(2009) Modification métaboliques, moléculaires et génotoxicité par le cadmium chez *Vicia f.* Thèse de doctorat. Université de Carthage, 238p.

.STREETER D.(2011) Guide Delachaux des fleurs de France et d'Europe. France: Delachaux et Niestlé.

T

.Thiebault, C., et Sprumont, P. (2005). Le sport après 50 ans (1é éd). Université Bruxelles: De boeck.

.Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, Ohyama W.(2007) Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 627(1), 41-58.

V

Vander Meer QP, Allium cepaL. cv. Groupe Common Onion.In: Siemonsma J.S.,KasemPiluek. Plant resources of South-EastAsia. PudocScientific, 1993.

ANNEXE

Préparation de HCL (1N) :

La solution de 100ml :

HCL8,17ml

Eau distillé91,83ml

Dans un bécher on ajoute 8,17ml d'HCL et complété jusqu'à 100ml d'eau distillé.

(Prépare sur la hotte chimique)

Réactif de Feulgen :

Préparation de 100ml :

Fushine basique0,5g

HCL (1N)10ml

K₂S₂O₅.....1g

Eau distillé100ml

Préparation d'acide Acétique Glacial à 45% :

Préparation de 100ml :

Acide Acétique Glacial45ml

Eau distillé55ml

(Prépare sur la hotte chimique)

Préparation de carnoy :

Ethanol60ml

Acide acétique20ml

Dans bécher de 100ml, verrez 60ml éthanol puis 20ml acide acétique (conserver le carnoy dans un flacon en verre à 4°C)

Préparation TCA 20% :

Peser 20g de TCA dans le verre de montre (Mettez cette quantité dans le bécher)

-Ajouter 100ml de l'eau distillé.

Réactif thioartibitricacid(TBA) :

Peser 0,67g de TBA dans le verre de montre (Mettez cette quantité dans le bécher)

-Ajouter 1000ml de NaOH

-Agiter jusqu'à dissoudre complètement de TBA.

Tampon phosphate saline (BS) :

Pour préparer 1000ml de PBS

Commencez avec 800ml de l'eau distillée

-Ajouter 8g NaCL (137,7 mM) + 0,2 g de KCL (2,7mM) + 1,44g de NaHP₄ + 0,24g de KH₂PO₄.

-Ajouter de l'eau distillée jusqu'à un volume total de 1000 ml

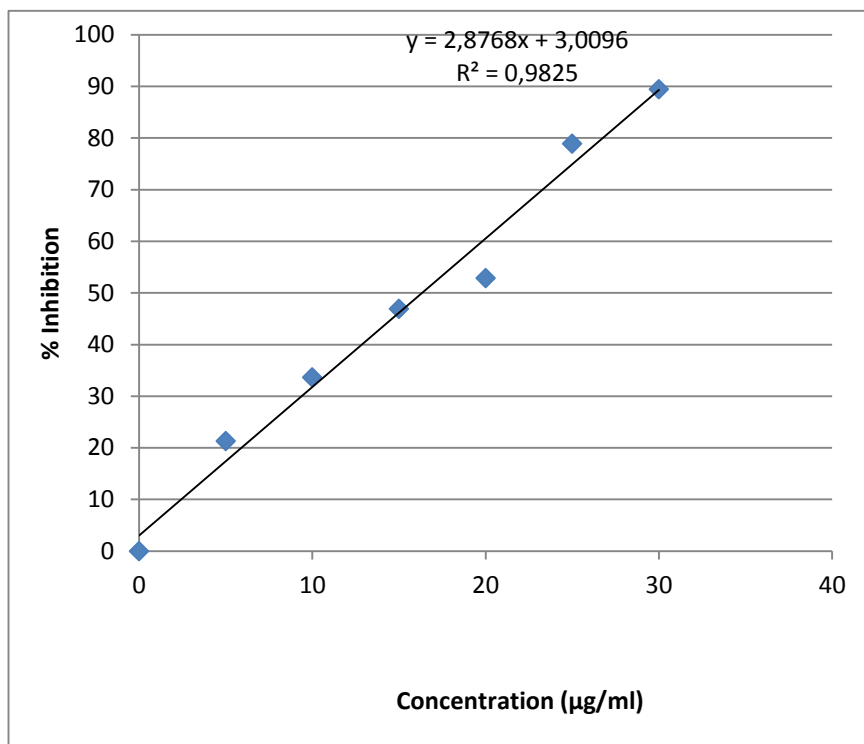
-Mettre la solution dans un flacon, puis stocker à température ambiante.

Eau physiologies (NaCL 0,9%) :

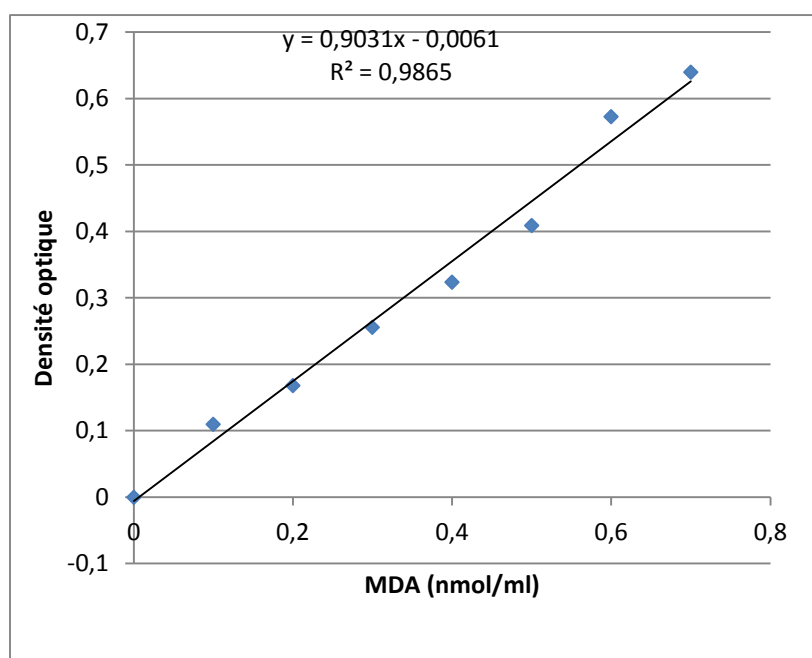
-Peser 9g NaCL dans le verre de montre (Mettre cette quantité dans le bécher)

-Ajouter 200ml eau distillé en rinçant le verre de montre. (Agiter jusqu'à dissoudre complètement le NaCL).

- Ajouter l'eau distillée jusqu'à un volume total de 1000 ml



Effet scavenger de l'acide ascorbique sur le radical DPPH



Courbe d'étalonnage de l'MDA avec le réactif de TEBARS