

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité: Ecotoxicologie animale

Intitulé :

Evaluation de l'effet cytotoxique et génotoxique de l'extrait  
aqueux de *Clematis cirrhosa*

Présenté Par :

- Bouhali Zoubeyda
- Bouzered Chourouk
- Brighet Asma

Membre de Jury :

- |                                 |              |                                |
|---------------------------------|--------------|--------------------------------|
| ✓ Slimani Souheila (professeur) | Présidente   | Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda |
| ✓ Nasser Meryem (MCA)           | Promotrice   | Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda |
| ✓ Souilah Nabila (MCA)          | Examinatrice | Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda |

Année universitaire 2022/2023

## *Remerciements*

*Avant tout nous remercions le Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier notre cher Madame Nasser Meryem pour son expertise, sa patience et son dévouement à nos aidons à façonner notre travail de recherche, ses idées éclairées, ses commentaires constructifs et sa disponibilité ont été d'une importance cruciale pour le développement de notre mémoire.*

*Nous souhaitons également adresser nos remerciements aux membres de jury, Professeur. Slimani Souheila, de nous avoir honoré de présider notre jury de soutenance et Professeur. Souilah Nabila qui a bien voulu examiner cette mémoire.*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce travail par soutien moral ou matériel.*

*Dédicace :*

*C'est avec l'aide et la grâce d'Allah que j'ai achevé ce modeste travail  
que je dédie*

*À mon très cher père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et  
le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts  
fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le  
fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour  
mon éducation et ma formation.*

*À ma très chère mère*

*Tu représentes pour moi la source de lumière, la source de tendresse, la  
source de la bonheur inépuisable et l'exemple du dévouement qui n'a pas  
cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta force de caractère et ta  
bienveillance et ton amour m'ont portée tout au long de ces années  
d'études.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce  
que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner  
depuis ma*

*naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*À mes sœurs et mon frère*

*Yousra, Aridj et Abd Erahmen*

*Vous êtes ma tribu, ma famille, mes alliés inébranlables*

*À mon cher fiancé*

*Ziad*

*À mes chères amies*

*Amira et Ibtissem*

*Vous êtes ma famille de cœur, mes confidents*

*À ma grande mère Houria que dieu prolonge sa vie.*

*Chourouk*

*Dédicace :*

*C'est avec l'aide et la grâce d'Allah que j'ai achevé ce modeste travail  
que je dédie*

*À mon très cher père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et  
le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts  
fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le  
fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour  
mon éducation et ma formation.*

*À ma très chère mère*

*Tu représentes pour moi la source de lumière, la source de tendresse, la  
source de la bonheur inépuisable et l'exemple du dévouement qui n'a pas  
cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta force de caractère et ta  
bienveillance et ton amour m'ont portée tout au long de ces années  
d'études.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce  
que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner  
depuis ma*

*naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*À mes sœurs et mon frère*

*Kenza ,Rayane et Chouaib*

*Vous êtes ma tribu, ma famille, mes alliés inébranlables*

*À toute ma famille*

*À mes chères amies*

*Asma et Amani*

*Vous êtes ma famille de cœur, mes confidents*

*Zoubeyda*

*Dédicace :*

*C'est avec l'aide et la grâce d'Allah que j'ai achevé ce modeste travail  
que je dédie*

*À mon très cher père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et  
le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts  
fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le  
fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour  
mon éducation et ma formation.*

*À ma très chère mère*

*Tu représentes pour moi la source de lumière, la source de tendresse, la  
source de la bonheur inépuisable et l'exemple du dévouement qui n'a pas  
cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta force de caractère et ta  
bienveillance et ton amour m'ont portée tout au long de ces années  
d'études.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce  
que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner  
depuis ma*

*naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*À mes frères et ma sœur*

*Oussama, Amine et Ouissem*

*Vous êtes ma tribu, ma famille, mes alliés inébranlables*

*À toute ma famille*

*À mes chères amies*

*Asma et Zoubeyda*

*Vous êtes ma famille de cœur, mes confidents*

*Asma*

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Répartition géographique du genre <i>Clematis</i> dans le monde	3
02	Photo de <i>Clematis cirrhosa</i>	4
03	Exemple des noyaux endommagés révélés par le test de comètes	8
04	Principe du test de Micronoyaux	9
05	Les différentes phases du cycle cellulaire	11
06	Illustration de l'allélopathie	13
07	Les étapes de l'extraction méthanolique de <i>Clematis cirrhosa</i>	16
08	Les concentrations préparées de l'extrait du <i>Clematis cirrhosa</i> dans le laboratoire	16
09	Test allélopathique sur les graines de l' <i>Allium cepa</i> avec les différentes concentrations de l'extrait de <i>Clematis cirrhosa</i>	17
10	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	19
11	Courbe d'étalonnage de la Quercetine	19
12	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	20
13	Courbe d'étalonnage de la Catéchine	21
14	Pourcentage de germination pour les concentrations avant et après le traitement par l'extrait <i>Clematis cirrhosa</i>	22
15	Effet des différentes concentrations de l'extrait de <i>Clematis cirrhosa</i> sur le temps moyen de germination.	23
16	L'indice mitotique pour les différentes concentrations de l'extrait <i>Clematis cirrhosa</i>	24
17	Indice d'aberration chromosomique pour toutes les différentes concentrations avant et après traitement de <i>Clematis cirrhosa</i> sur l' <i>Allium cepa</i>	26
18	Les différentes aberrations observées chez les cellules racinaires d' <i>Allium cepa</i> par l'extrait de <i>Clematis cirrhosa</i> sous microscope optique (x40)	27
19	L'activité antioxydant de l'extrait méthanolique de <i>Clematis cirrhosa</i> a des différentes concentrations	28

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Classification botanique de <i>Clematis cirrhosa</i>	4
02	Variation de la longueur racinaire selon les concentrations testées de l'extrait aqueux de <i>Clematis cirrhosa</i>	24
03	L'effet de l'extrait de <i>Clematis cirrhosa</i> sur la division cellulaire de l' <i>Allium cepa</i>	25
04	Fréquence des différents types d'aberrations chromosomiques	26
05	Les teneurs en polyphénols ; en flavonoïdes et en tanins de l'extrait de <i>Clematis cirrhosa</i>	28
06	Les valeurs d'IC <sub>50</sub> , EC <sub>50</sub> , APR de l'extrait méthanolique de <i>Clematis cirrhosa</i> par rapport à l'acide ascorbique	29

## Liste des abréviations

<b>AA</b>	Acide acétique.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure d'aluminium.
<b>APR</b>	Le pouvoir anti-radicalaire relatif.
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique.
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate.
<b>CAT</b>	Equivalents de la catéchine.
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazile .
<b>EAG</b>	Equivalent en acide gallique.
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentration effective à 50%.
<b>EQ</b>	Equivalent de quercétine.
<b>IA</b>	Indice d'aberrations chromosomiques.
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition.
<b>IM</b>	Indice mitotique.
<b>MN</b>	Micro noyaux.
<b>MTOC</b>	Centre d'organisation des microtubules.
<b>NaO<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Centre d'organisation des microtubules.
<b>PG</b>	Pourcentage de germination.
<b>RG</b>	Croissance racinaire.
<b>TMG</b>	Temps moyen de germination.
<b>UV</b>	Ultraviolet.

# Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

## Chapitre 1. Généralités

1. Généralité sur la famille des Ranunculacées 2

2. Généralités sur le genre du *Clematis* 2

2 .1.Description botanique 2

2 .2. Distribution géographique du genre *Clematis* dans le monde 3

3. Description botanique de l'espèce *Clematis cirrhosa* 3

3.1. Distribution géographique de l'espèce *Clematis cirrhosa* en Algérie 4

3.2. Classification botanique de l'espèce *Clematis cirrhosa* 4

4. Utilisation des espèces appartenant au genre *Clematis* en médecine traditionnelle 5

5. Utilisation de l'espèce *Clematis cirrhosa* en médecine traditionnelle 5

6. Toxicité 6

## Chapitre 2. La cytotoxicité et la génotoxicité

2.1. Définition de cytotoxicité 7

2.2. Les tests de cytotoxicité 7

2.3. définition de génotoxicité 7

2.4. les tests utilisé dans la détection de la génotoxicité 8

2.4.1. Test de comet 8

2.4.2. Test de micronoyaux 8

2. 4.3. Test des aberrations chromosomiques 9

2.4.4. Test d'ames 10

## Chapitre 3. Le cycle cellulaire

3.1. Généralités sur le cycle cellulaire	11
3.2. Généralité sur l'allélopathie	12
3.3. Généralités sur les métabolites secondaires	14
3.3.1 Classification des métabolites secondaires	15
<b>1. Matériel et méthodes</b>	15
1.1. Matériel végétale	16
1.2. Méthodes	16
1.2.1. Extraction	16
1.2.2. Préparation de la gamme de concentrations testées de l'extrait de <i>Clematis cirrhosa</i>	16
1.2. 3. Test allélopathique	17
1.2.4. Le test de cytotoxicité et génotoxicité	18
1.2.5. L'analyse phytochimique	18
a. Dosage des polyphénols totaux	18
b. Dosage des flavonoïdes	19
c. L'activité antioxydante	20
d. Dosage des tanins condensés	21
1.2.6. L'analyse statistique	21
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>2.1. Résultats</b>	22
2.1.1. Evaluation de l'activité allélopathique de l'extrait aqueux de <i>Clematis cirrhosa</i>	22
2.2.2. Evaluation de l'activité cytotoxique	23
2.2.3. Evaluation de l'activité génotoxique.	25
2.2.4. L'analyse phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>Clematis cirrhosa</i>	27
a. Dosage des polyphénols	27
b. Dosage des flavonoïdes	27
c. Dosage des tanins	28
d. L'activité antioxydante	28

<b>2 .2. Discussion</b>	30
2.2.1. Allélopathie	30
2.2.2. Indice mitotique	31
2.2.3. Indice d'aberration chromosomique	32
2.2.4. Dosages des polyphénols	33
2.2.5. L'activité antioxydante	34
<b>Conclusion</b>	35
<b>Résumé</b>	
<b>Références</b>	

# **Introduction**

### Introduction

Les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans la médecine traditionnelle et alternative depuis des millénaires. Leur utilisation remonte à l'Antiquité, où les civilisations anciennes ont découvert les propriétés curatives de certaines espèces végétales (Bodeker et *al.*, 2014). Aujourd'hui encore, les plantes médicinales continuent d'être étudiées et utilisées pour leurs nombreux bienfaits sur la santé humaine car ils sont riches en composés bioactifs, qui peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine (Cragg et *al.*, 2013).

Parmi ces composés, certains ont démontré des propriétés cytotoxiques et génotoxiques, ce qui en fait des candidats prometteurs dans la lutte contre les cellules cancéreuses. Ces plantes médicinales, utilisées dans le cadre de la recherche sur le cancer, offrent un potentiel pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux (Goyal et *al.*, 2016).

Les plantes médicinales bioactives sont également explorées pour leurs propriétés allélopathiques. Certains de ces composés peuvent être utilisés comme biopesticides, offrant ainsi une alternative naturelle aux produits chimiques de synthèse. Ces biopesticides à base de plantes peuvent aider à contrôler les parasites et les organismes nuisibles de manière écologique, réduisant ainsi l'impact néfaste sur l'environnement et la santé humaine (Isman et *al.*, 2006).

Ces constituants peuvent présenter à un certain degré de concentration une toxicité intrinsèque (Zekkour, 2008). *Clematis cirrhosa* est une plante médicinale appartenant à la famille des Renonculacées. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle pour les douleurs rhumatismales et comme agent diurétique (Chawla et *al.*, 2012). Nous nous sommes intéressés dans le présent travail, à l'étude de l'activité allélopathique, cytotoxique et génotoxique de l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* sur un modèle végétal qui est l'*Allium cepa*.

La présente étude comporte trois parties

- La première est consacrée à une synthèse bibliographique sur la plante choisie : la description botanique et distribution, usages en médecine traditionnelle.
- La deuxième concerne la partie expérimentale : notamment la récolte, l'extraction du matériel végétal, ainsi que les protocoles décrivant les tests utilisés.
- La troisième partie est une description et interprétation des résultats obtenues.
- Ce travail s'achève par une conclusion.

# **Partie bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Généralités**

### Chapitre 1. Généralités

#### 1. Généralité sur la famille des Ranunculacées

La famille des Ranunculaceae compte environ 60 genres et 2200 espèces. Les Ranunculaceae sont des herbes ou des sous-arbrisseaux sarmenteux, leurs racines sont le plus souvent composées de fibres épaisses ou de tubercules disposés en faisceau, leurs feuilles sont alternées ou opposées, toujours simples et dépourvues de stipules, tantôt entières et découpées, fréquemment élargies à leur base en forme de gaine. Da-Ching et *al.*(2015) a divisé les renonculacées en cinq sous-familles (Hydrastidoideae, Thalictroideae, Isopyroideae, Ranunculoideae et Helleboroideae), principalement basé sur les caractéristiques chromosomiques et florales(Tamura,1993).

#### 2. Généralités sur le genre *Clematis*

*Clematis*, l'un des plus grands genres de la famille Ranunculaceae et également connu sous le nom de pivoine clématite, est un genre d'environ 355 espèces de renoncules, réparties principalement dans les régions tempérées au nord de l'équateur terrestre, des lianes ligneuses typiques. Les clématites jouent un rôle important dans les jardins botaniques en raison de leurs fleurs uniques, de leurs couleurs riches et de leurs tiges filiformes et sont considérées comme la reine des plantes grimpanes (Beutler, 2014). Les plantes du genre *Clematis* font l'objet de multiples usages thérapeutiques traditionnels.

Les parties aériennes de diverses espèces de *Clematis*, sont particulièrement utilisées en Europe et en Asie de l'Est comme diurétique, antipaludéen, antidote dans les morsures de serpents, l'anti dysenterie et pour le traitement des rhumatismes, fièvre, infections oculaires, symptômes gonorrhéiques, maladies osseuses, troubles cutanés chroniques, goutte et varicosité (Gruenwald, 2000 ; Chawla et *al.*, 2012).

##### 2.1. Description botanique

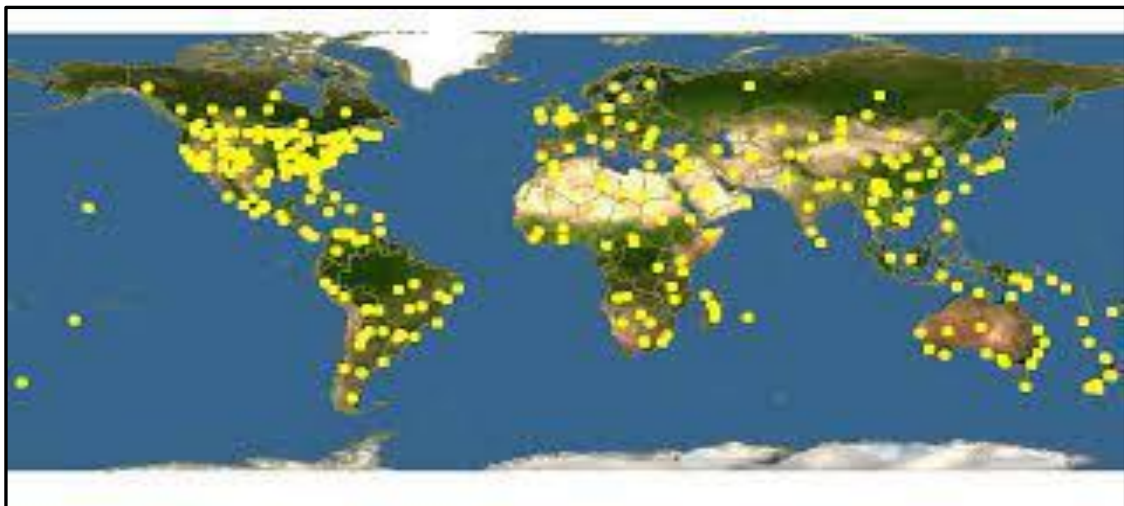
Ce sont des plantes grimpanes ligneuses, ou des plantes herbacées à feuilles pétiolées à sessiles, opposées à la tige et principalement composées pennées ou bipennées avec trois à cinq folioles. Les tiges sont des ficelles comme une vrille (vrille pétiolée) et sont chargées de soutenir la plante (Saber, 1954).

Les fleurs sont actinomorphes, solitaires ou en panicules de quelques à nombreuses fleurs, peu visibles à voyantes, avec quatre à cinq sépales ressemblant à des pétales (pas de vrais pétales), séparés à légèrement joints à la base, minces à coriaces, blanches ou de différentes couleurs, pétaloïdes, valvées en bouton, s'étalant en forme de coupe (Quezel et Santa, 1963).

La hauteur de la plante est de 3 à 6 mètres, et elle préfère l'éclairage direct ou semi-ombragé, et il est préférable d'irriguer la plante régulièrement, et c'est l'une des plantes résistantes à la sécheresse (Dachenget *al.*, 2013).

### 2.2. Distribution géographique du genre *Clematis* dans le monde

*Clematis* existe dans la péninsule ibérique, la péninsule des Apennins, la péninsule Balkanique, la Turquie, Amérique, la Méditerranée orientale, le Nord-Ouest de l'Afrique et la Libye, distribué dans les régions tempérées au nord de l'équateur de la terre, Elle est d'origine méditerranéenne du Portugal et le Maroc jusqu'à l'Asie Mineure , Himalaya (Tela botanica, 2011) qui sont des vignes boisées typiques allant des régions tropicales aux zones glaciales et du niveau de la mer aux hautes altitudes (Zhang et *al.*, 2015)(Figure 1).



**Figure 1.** Répartition géographique du genre *Clematis* dans le monde (Anonyme)

### 3. Description botanique de l'espèce *Clematis cirrhosa*

*Clematis cirrhosa* a été décrit en 1753 par Carl Linnaeus. Ces feuilles sont pendantes en cloches, assez grandes (2.5 à 3 cm), fasciculées, simples, trifides ou tripartites avec des bords entiers, lobés ou incisés-dentés solitaires (Quezel et Santa,1963) est une plante à tige sarmenteuse, grimpante, presque glabre, feuilles fasciculées, tantôt simples, tantôt trifides ou tripartites à bords entiers, incisés-dentés ou lobés, fleurs blanches, grandes, penchées, solitaires, entourées d'un involucre en forme de calice monosépale , sépales velus en dehors, glabres en dedans, pétales nuls, réceptacle poilu, carpelles à arête plumeuse (Figure 2). La floraison de cette plante commence de Mars à Décembre (Quezel et Santa, 1963).



**Figure 2.** *Clematis cirrhosa* (Benamar, 2020)

### 3.1. Distribution géographique de l'espèce *Clematis cirrhosa* en Algérie

En Algérie, elle existe dans toute la zone bien arrosée du littoral Méditerranéen et propage principalement dans les broussailles et les forêts (Skikda, Alger, Souk Ahras, Oran, Tiert) (Quezel et Santa, 1963).

### 3.2. Classification botanique de l'espèce *Clematis cirrhosa*

Le genre *Clematis* a été publié pour la première fois par Carl Linné dans *Species Plantarum* en 1753, la première espèce citée étant *Clematis viticella*. Le nom du genre est bien antérieur à Linné. Il était utilisé en grec classique pour diverses plantes grimpantes.

**Tableau 1.** Classification botanique de *Clematis cirrhosa* L selon Gurcharan (2004).

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Ranunculales
<b>Famille</b>	Ranunculaceae
<b>Sous-famille</b>	Clematideae
<b>Genre</b>	<i>Clematis</i> L
<b>Espèce</b>	<i>Clematis cirrhosa</i> L

### 4. Utilisation des espèces appartenant au genre *Clematis* en médecine traditionnelle

Vingt-six espèces du genre *Clematis* ont été traditionnellement utilisées en médecine pour le traitement des maladies telles que les troubles nerveux, la syphilis, la goutte, le paludisme, la dysenterie, les rhumatismes, l'asthme, comme analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, anti-tumorales, antibactériennes, anticancéreuses et contre les ampoules et comme cataplasme pour les plaies et les ulcères en phase de cicatrisation (Chawla et al., 2012).

Les utilisations traditionnelles des espèces de *Clematis* dans le traitement du cancer et des maladies inflammatoires ont été validées par la pharmacologie moderne. Par exemple, *C. chinensis*, *C. mandshurica*, *C. microphylla*, *C. glycinoides*, *C. ligusticifolia* et *C. brachiata* ont démontré une activité anti-inflammatoire (Jangwan et Dobhal, 2008 ; Peng et al., 2009), tandis que *C. manshurica*, *C. montana* et *C. apiifolia* ont montré des activités anticancéreuses (Fu et al., 2010 ; Hsieh et al., 2011).

- **L'espèce *Clematis vitalba***: La clématite des haies, appelée communément clématite vigne-blanche est employée exclusivement en usage externe. Elle présente des effets veinotoniques et antinévralgiques, tout en permettant de diminuer les douleurs rhumatismales, et elle peut être indiquée comme analgésique local (Pieroni et al., 2002).
- **L'espèce *Clematis tangutica***: Le glucoside d'hérédagénine de *Clematis tangutica* a montré une activité antimicrobienne *in vitro* (Zhizhi et al., 2003).
- **L'espèce *Clematis rehderiana***: L'isovitexine 6"-O-E-p-coumarate, un flavonoïde de *Clematis rehderiana*, a montré une activité antioxydant (Du et al., 2010).
- **L'espèce *Clematis erecta***: est utilisée en médecine homéopathique pour les ulcères cancéreux et nauséabonds. Elle est utilisée par voie orale pour soulager les douleurs rhumatismales, les varices, la goutte et comme diurétique (Chawla et al., 2012).
- En médecine traditionnelle Algérienne, les tradipraticiens ont utilisé l'infusion de *Clematis flammula* comme un traitement de l'arthrite et des brûlures mineures (Atmaniet al., 2009).

### 5. Utilisation de l'espèce *Clematis cirrhosa* en médecine traditionnelle

*Clematis cirrhosa* L est utilisée pour soigner les brûlures, la plante fraîche est utilisée pour traiter la maladie dite bûzelûm (un type de sciatique) (Lahsissene, 2009). La clématite est une source végétale de nombreux ingrédients actifs médicinaux et des métabolites spécialisés peuvent être utilisés comme médicament pour désobstruer les canaux (Chohraetal., 2020).

Les racines, en cataplasme, sont vulnérables et utilisées pour soigner les brûlures. La clématite est également indiquée dans les refroidissements, les maladies du foie et de la rate (Alaoui et Laaribya, 2017). En Algérie, les feuilles en décoction sont utilisées pour soulager les douleurs rhumatismales (Miara et al., 2019).

### 6. Toxicité

Une étude approfondie a révélé que la protoanemonine et l'acide aristolochique présents chez les espèces de *Clematis* provoquent de graves effets toxiques, la protoanemonine est extrêmement irritante pour la peau et les muqueuses (Tilford, 1997).

# **Chapitre 2**

## **La cytotoxicité et la génotoxicité**

### Chapitre 2. Cytotoxicité et génotoxicité

#### 2. 1. Définition de la cytotoxicité

La mort cellulaire par des effets endogènes et (ou) exogènes est appelée cytotoxicité, donc l'effet qui mène à la mort cellulaire est appelé effet cytotoxique. L'effet cytotoxique peut être physique, chimique ou biologique. Les substances chimiques et biologiques ou des agents physiques peuvent provoquer une cytotoxicité en affectant les cellules à des degrés divers (Istifli et Ila, 2019).

#### 2. 2. Les tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité sont parmi les premiers tests biologiques *in vitro* utilisés pour prédire la toxicité de diverses substances dans différents tissus (Istifli et Ila, 2019). Ces tests ont été mis au point comme méthode alternative à la manipulation sur les animaux (rongeurs, lapin, cochon,...).

Le test de cytotoxicité permet la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire par une méthode évaluant un paramètre donné (croissance cellulaire, intégrité cellulaire, activité fonctionnelle cellulaire...).

Plusieurs méthodes d'étude de la cytotoxicité existent à ce jour ; entre autres les méthodes fondées sur des perturbations de la perméabilité membranaire et les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire (Ahou Kouame, 2009).

#### 2. 3. Définition de la génotoxicité

La génotoxicité est un concept qui fait référence à la capacité d'une substance ou d'un agent à endommager l'ADN (acide désoxyribonucléique) des cellules vivantes. L'ADN est la molécule qui porte l'information génétique dans toutes les cellules et il est essentiel au fonctionnement normal de l'organisme. Lorsque l'ADN est endommagé, cela peut entraîner des mutations génétiques et des altérations dans la structure et la fonction des gènes (De Flora *et al.*, 2007).

Les agents génotoxiques peuvent être des produits chimiques, des radiations ionisantes et non ionisantes, des virus, des bactéries et d'autres agents environnementaux. Lorsqu'un agent génotoxique entre en contact avec une cellule, il peut provoquer différents types de dommages à l'ADN, tels que des cassures simples ou doubles brins, des altérations de bases et des liens covalents entre les bases et l'agent génotoxique (De Flora *et al.*, 2007).

Les effets de la génotoxicité peuvent varier en fonction de la nature de l'agent génotoxique et de la cellule cible. Les effets les plus graves peuvent entraîner la mort cellulaire, la perturbation de la réplication de l'ADN, la recombinaison génétique et la mutation.

Les mutations peuvent affecter la fonction cellulaire normale, y compris la régulation de la croissance cellulaire et la réponse aux signaux environnementaux. Dans certains cas, les mutations peuvent entraîner le développement de cancers et d'autres maladies chroniques (Natarajan, 1993).

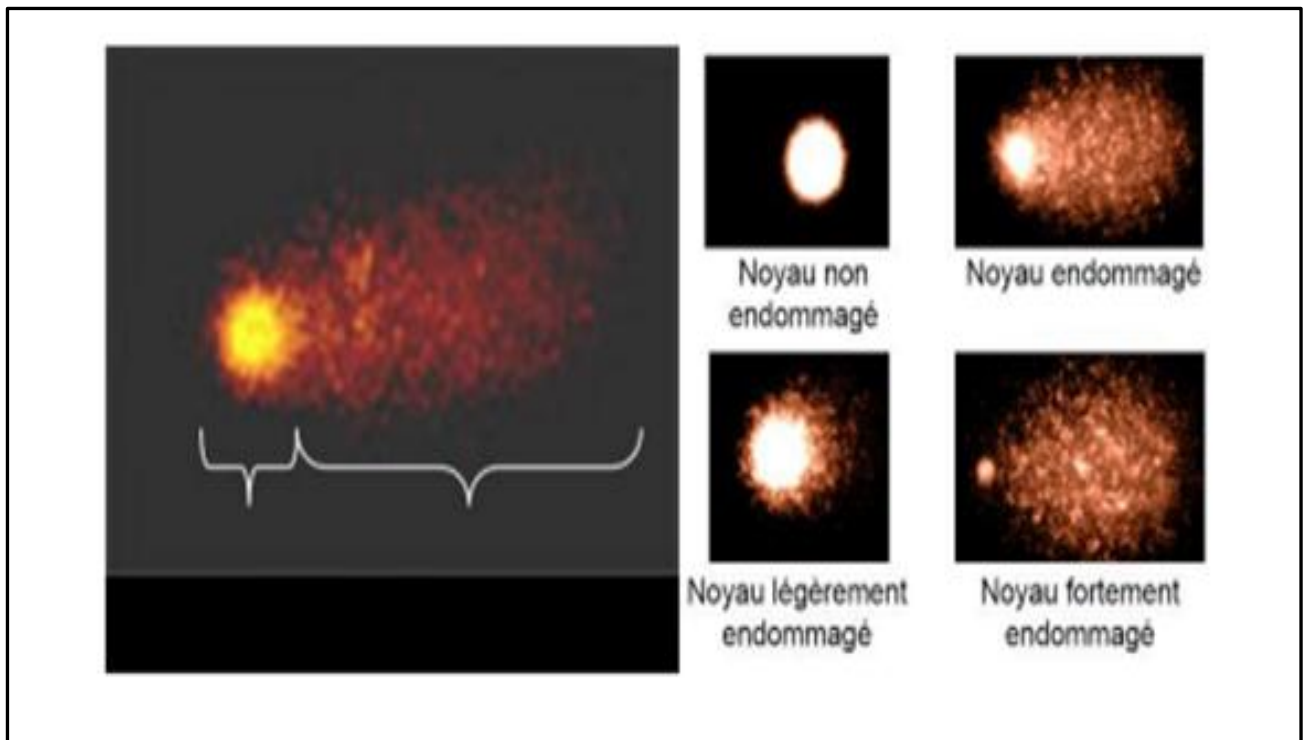
### 2. 4. Les tests utilisés dans la détection de la génotoxicité

Il existe plusieurs tests utilisés pour détecter la génotoxicité des substances, tels que :

#### 2.4.1. Test de comète

Le test de comète, également appelé test de la queue de comète, est une méthode couramment utilisée pour évaluer les cassures de l'ADN dans les cellules exposées à des substances génotoxiques. Les cellules sont exposées à la substance testée pendant une période donnée, puis enrobées dans une couche de gel. Les cellules sont ensuite soumises à une électrophorèse, qui étire l'ADN des cellules en fragments (Fenech et *al.*, 2011).

Les fragments d'ADN sont ensuite colorés et examinés sous microscope pour évaluer l'étendue des cassures dans l'ADN. Les cassures de l'ADN se produisent lorsque les liaisons chimiques entre les nucléotides de l'ADN sont rompues, ce qui peut entraîner des mutations génétiques (Fenech et *al.*, 2011).



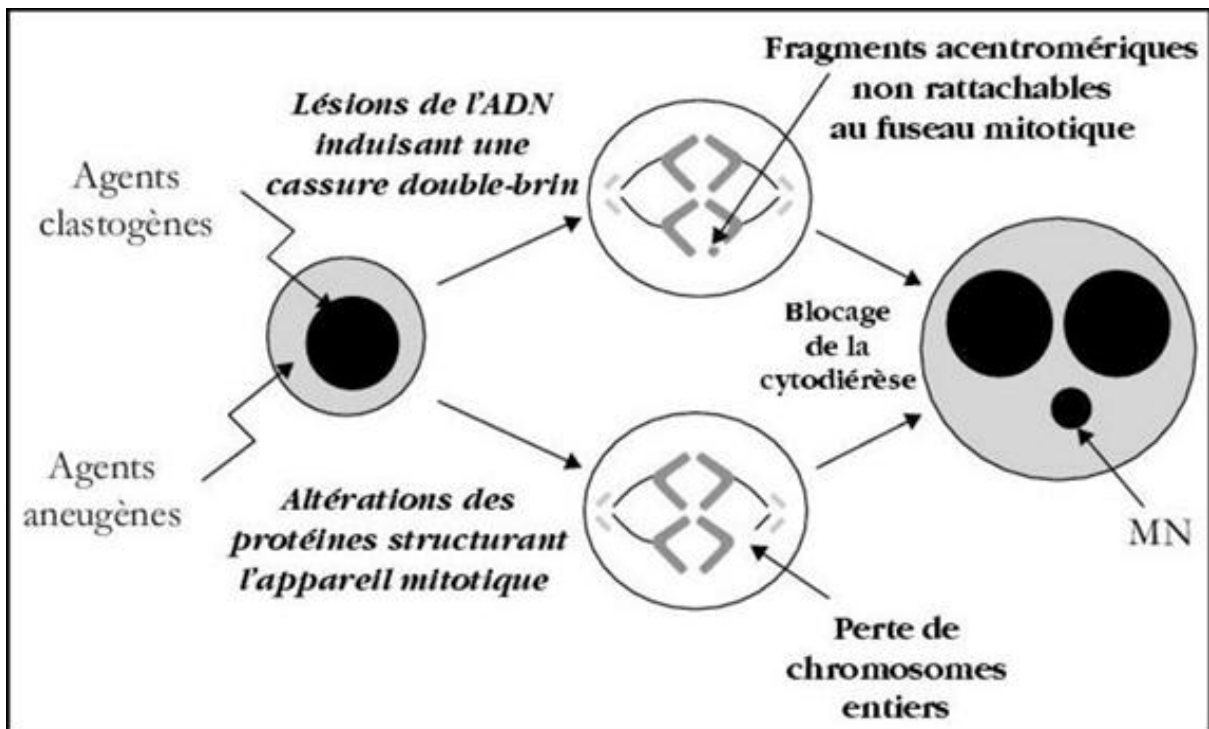
#### 2.4.2. Test de micronoyaux

Le test de micronoyaux est une méthode couramment utilisée pour évaluer les cassures chromosomiques et les aberrations chromosomiques chez les cellules exposées à des substances génotoxiques. Les cellules sont exposées à la substance testée pendant une période donnée, puis la division cellulaire est arrêtée et les cellules sont fixées (Bonassi et *al.*, 2007).

Les noyaux des cellules sont ensuite colorés et examinés sous microscope pour détecter les micronoyaux. Les micronoyaux sont des fragments de chromosomes qui se forment lorsque les chromosomes se cassent pendant la division cellulaire et ne sont pas incorporés dans le noyau des

deux cellules filles. La présence de micronoyaux est un indicateur de cassures chromosomiques (Lorans, 2009).

Le test de micronoyaux est un test sensible et fiable pour évaluer la génotoxicité des substances. Il peut être utilisé pour évaluer les effets génotoxiques de différents types de substances, y compris les produits chimiques, les médicaments, les radiations ionisantes et les rayonnements électromagnétiques. Le test de micronoyaux est également utilisé dans des études toxicologiques et de cancérogénicité pour évaluer le potentiel cancérogène des substances (Gauthier, 1989).



**Figure 4.** Principe du test de Micronoyaux (Larmarcovai et *al.*, 2007).

### 2.4.3. Test des aberrations chromosomiques

Les aberrations chromosomiques comprennent les modifications du nombre de chromosomes (gains et pertes) et les modifications structurelles (délétions, inversions et échanges). Les chromosomes peuvent être vus avec un microscope optique standard et bon nombre de ces types d'aberrations peuvent être vus. Récemment, l'association de sondes d'ADN marquées et de la microscopie à fluorescence a permis d'observer tous les types d'aberrations et d'identifier les chromosomes associés (Preston, 2014).

Cette méthode est basée sur le fait que la plupart des agents génotoxiques ont des propriétés clastogènes et inclut l'étude des anomalies chromosomiques observées sur les cellules en métaphase après exposition aux mutagènes. Ces anomalies sont le résultat de cassures de l'ADN, les fragments peuvent rejoindre le chromosome à leur emplacement d'origine, à un autre endroit ou pas du tout (Natarajan et *al.*, 1984).

### 2.4.4. Test d'Ames

Le test d'Ames est une méthode couramment utilisée pour évaluer la mutagenicité des substances. Ce test utilise une souche de bactéries spéciales qui sont incapables de synthétiser un acide aminé essentiel, l'histidine. Les bactéries sont exposées à la substance testée et cultivées sur un milieu de culture sans histidine. Si la substance testée est mutagène, elle peut induire une mutation dans les gènes des bactéries, leur permettant de synthétiser de l'histidine et de se multiplier sur le milieu de culture. Les bactéries sont ensuite comptées pour déterminer si la substance a causé une augmentation significative de la fréquence des colonies de bactéries (Pillco et Eduardo, 2014).

# **Chapitre 3**

## **Le cycle cellulaire**

## Chapitre 3. Le cycle cellulaire

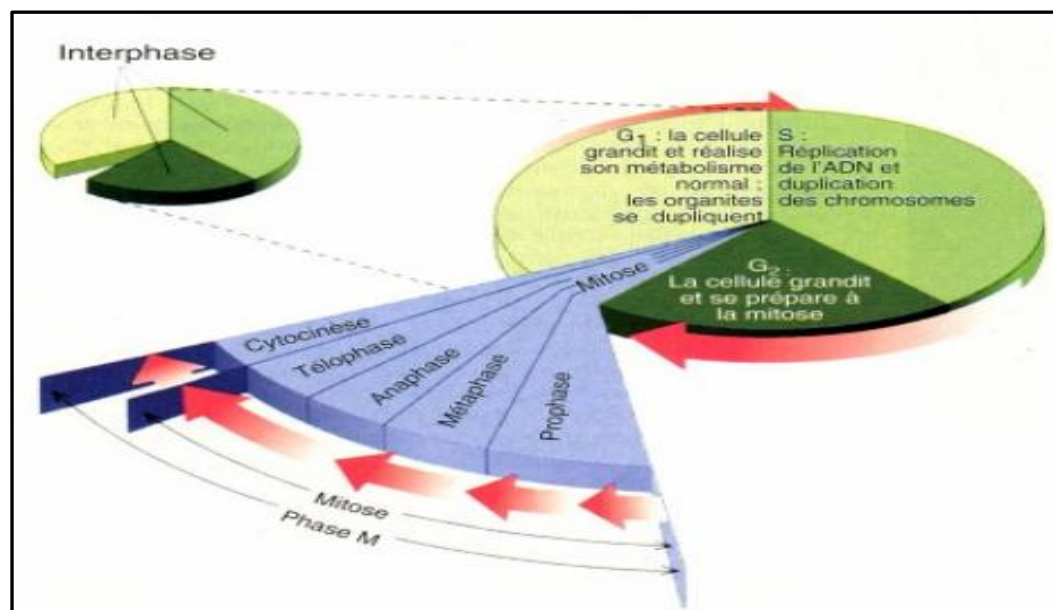
**3.1. Généralités sur le cycle cellulaire :** Le cycle cellulaire est la série de changements qu'une cellule subit entre la formation à 14, la division de la cellule mère et le moment où la cellule achève de se diviser en deux cellules filles par mitose, le cycle cellulaire comprend (Maillet, 2002) :

-Interphase

-Phase M ou mitose dans laquelle une cellule se divise pour produire deux cellules filles strictement similaires.

**1.1. Interphase :** En général, la phase utérine correspond à la majeure partie du cycle, ce qui décomposition en phases G1, S et G2 (Maillet, 2002) (Figure 5).

- **Phases G1 :** où la cellule synthétise les molécules d'ARN (ARNm, ARNr, ARNt) et assure la production des protéines nécessaires à la croissance cellulaire.
- **Phase S (synthèse S) :** correspondant à la réplication de l'ADN.
- **Phase G2 :** Cette phase prépare la mitose et se caractérise par des protéines motrices de la condensation des chromosomes.



**Figure 5.** Les différentes phases du cycle cellulaire (krap, 1998).

**1.2. La phase M ou mitose :** le processus de division cellulaire comprend, une division nucléaire (caryocinèse), une division cytoplasmique (cytodiérèse).

-**Prophase :** correspond à

- Division du centre d'organisation des microtubules (MTOC).
- Condensation chromosomique.
- Rupture de la membrane nucléaire.
- Début de la formation de tassas à l'extérieur de noyau.

**La prométaphase** : se caractérise par :

- La rupture complète de l'enveloppe nucléaire.
- La formation du fuseau achromatique.
- Le début d'alignement des chromosomes.

**Métaphase**: est caractérisée par le rassemblement de tous les chromosomes sur la plaque équatoriale. Le fuseau est constitué par un ensemble de microtubules (Karp, 1998) :

- Les microtubules de l'aster.
- Les microtubules polaires.
- Les microtubules kinétochoriens.

**L'anaphase** : correspond à la division des chromosomes en deux chromosomes identiques, qui sont caractérisés par :

- Allongement des microtubules polaires.
- Raccourcissement des microtubules du centromère.
- Migration des chromosomes vers la pôle.

**La télophase** : est une période caractérisée par :

- La fin est une Chemins de migration du chromosome au pôle.
- La disparition de fuseau.
- Dépolymérisation des chromosomes.
- Reconstruction de la capsule maculaire à partir du réticulum endoplasmique.
- Début de cytotérière.

### 3. 2. Généralité sur l'allélopathie

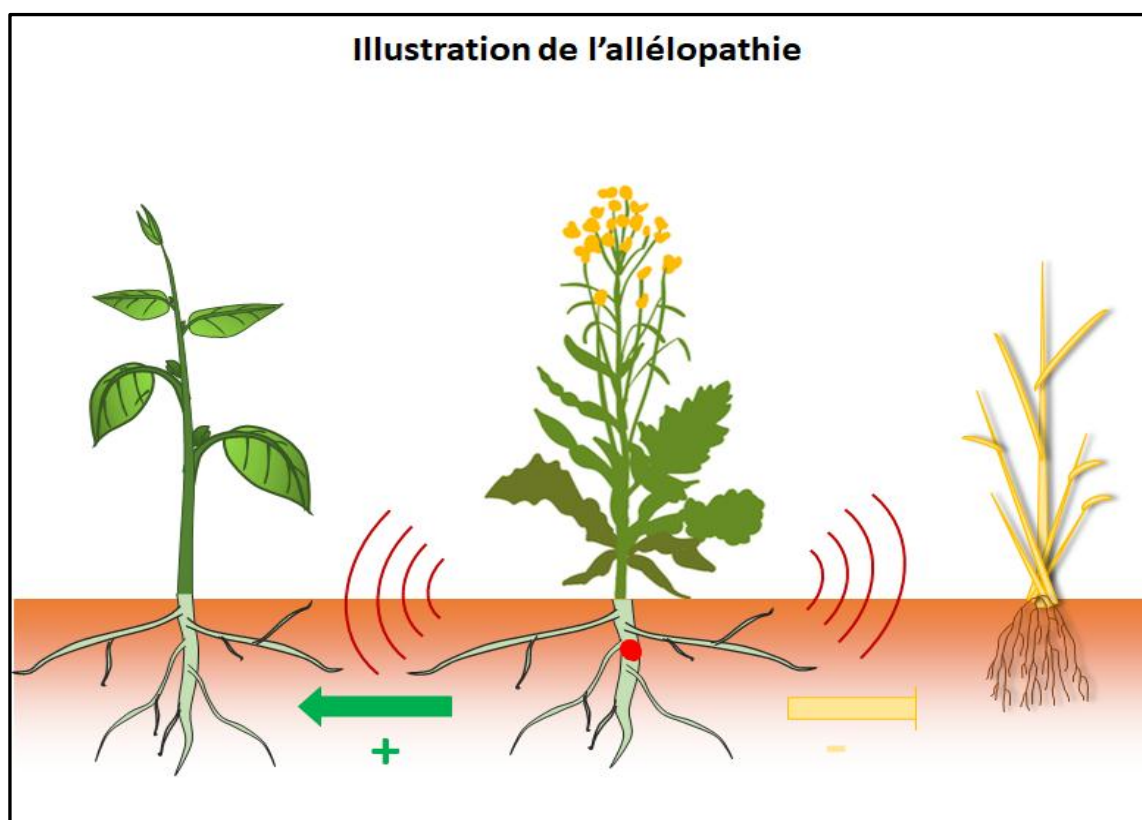
Le terme allélopathie a été initialement introduit par Molish en 1937 pour décrire les interactions biochimiques, à la fois bénéfiques et nocives, entre tous types de plantes ou micro-organismes. Cette définition a évolué avec les recherches effectuées au cours du temps pour se focaliser sur les effets négatifs, directs ou indirects, d'une plante sur une autre par la libération de composés chimiques dans l'environnement.

La définition communément admise aujourd'hui désigne le phénomène écologique par lequel une plante (ou un micro-organisme) influence le développement et la croissance d'autres espèces de plantes ou micro-organismes par la libération de métabolites secondaires, appelés composés allélochimiques, dans l'environnement.

Les composés allélopathiques affectant les processus fondamentaux de la plante, soit la photosynthèse, la synthèse des protéines, la production de la chlorophylle, les relations plante-eau, la perméabilité membranaire, la divisions cellulaire, la germination et l'absorption de nutriments (Einhellig, 1986 ; Ferguson *et al.*, 2003; Newman et Miller, 1977).

En outre, il est rapporté que les stress physiologiques et environnementaux peuvent moduler l'allélopathie, de ce fait, il joue un grand rôle dans l'établissement et le maintien des communautés végétales (Walker et *al.*, 2003 ; Ferguson et *al.*, 2003 ; Bouton, 2005).

L'allélopathie est largement répandue dans les écosystèmes et joue un rôle important dans l'allocation rationnelle des espèces, l'entretien des forêts, la lutte contre les mauvaises herbes, la lutte antiparasitaire et la prévention des maladies et contrôle (Peerzada et *al.*, 2017 ; Siri-Udom et *al.*, 2017). Ce phénomène est un facteur déterminant les interactions entre les végétaux (Blanco, 2007).



**Figure 6.** Illustration de l'allélopathie (Germain A et *al.*, 2022).

### 3. 3.Généralité sur les métabolites secondaires

De nombreuses plantes médicinales, tinctoriales ou aromatiques produisent une large gamme de substances chimiques de structures différentes. Parmi ceux-ci, une distinction est généralement faite entre les métabolites primaires et secondaires.

Les métabolites primaires sont dérivés du métabolisme primaire, qui représente tous les processus fondamentaux vitaux pour les plantes, tels que la croissance ou la respiration. Les métabolites primaires proviennent de ces réactions et sont des composants importants de la machinerie moléculaire cellulaire (acides nucléiques, protéines, lipides et glucides)(Macheix et *al.*, 2005).

Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas directement produits lors de la photosynthèse, mais sont synthétisés à partir de métabolites primaires et produits par des réactions chimiques ultérieures.

Les métabolites secondaires ne sont pas essentiels à la vie végétale, mais jouent un rôle dans l'interaction des plantes avec leur environnement, assurant la pérennité des plantes dans leurs écosystèmes.

La formation de métabolites secondaires est généralement spécifique à un organe, un tissu et une cellule et ce sont des composés de faible poids moléculaire. Les quantités et les types de ces composés varient souvent entre les individus d'une même population végétale. Ils protègent les plantes contre les stress biotiques (bactéries, champignons, nématodes, insectes ou pâturage des animaux) et abiotiques (température et humidité plus élevées, ombre, blessures ou présence de métaux lourds) (Pagaré et *al.*, 2015).

Il a été démontré que les métabolites secondaires ont de multiples effets biologiques, fournissant une base scientifique à l'utilisation des herbes en médecine traditionnelle dans de nombreuses communautés anciennes. Ils ont été décrits comme des antibiotiques, des antifongiques et des antiviraux, donc capables de protéger les plantes des agents pathogènes. De plus, ce sont d'importants composés absorbant les UV et préviennent ainsi les photos dommages graves des feuilles. Certaines graminées, telles que les graminées de pâturage telles que le trèfle ou la luzerne, ont été notées pour exprimer des propriétés œstrogéniques et interagir avec la fertilité animale. (Bennetts et *al.*, 1946).

Aujourd'hui, ces métabolites secondaires constituent l'un des leviers d'une possible intensification agroécologique, notamment en substituant les mécanismes naturels de défense des plantes à l'utilisation d'intrants chimiques. D'un point de vue pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés présents dans les plantes, et on estime qu'environ un tiers des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale (Newman et *al.*, 2012).

### 3.1. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des plantes sont un groupe très large de composés, souvent classés en fonction de leurs voies de biosynthèse. Trois grandes familles moléculaires sont généralement considérées : les composés polyphénoliques, les terpènes et les stéroïdes, et les composés azotés ou alcaloïdes (Guignard et *al.*, 1985) (Bruneton, 1999). Chacune de ces classes regroupe une très large gamme de composés à très large spectre d'activité en biologie humaine (Bruneton, 1993) :

- Composés phénoliques
- Terpènes
- Alcaloïdes

# **Partie expérimentale**

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.1. Matériel végétale

*Clematis cirrhosa* est une espèce qui propage abondamment dans la région de Jean d'Arc (wilaya de Skikda) cette dernière se caractérise par un climat méditerranéen humide. Après avoir récolté une quantité suffisante de *Clematis cirrhosa*, les feuilles et les fleurs ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 32 jours.

Après le séchage, l'échantillon est broyé avec un tamise jusqu'à l'obtention d'une poudre de granulométrie homogène qui permet l'extraction d'un taux important des composés. La poudre est conservée dans des sachets bien fermés. L'espèce a été identifiée et récoltée par Dr. Sakhraoui N (Botaniste à notre département).

#### 1.2. Méthodes

##### 1.2.1. Extraction

100 g de la poudre végétale a été mis dans un dessiccateur avec 1L de méthanol pendant 48h, à l'abri de la lumière. Après la filtration du macérât, il a été mis pour évaporation dans un évaporateur rotatif sous vide jusqu'à l'obtention d'un liquide concentré. L'extrait liquide obtenu a subi un séchage pendant 29h dans l'étuve réglée à 40°C (Figure 7).



**Figure 7.** Les étapes de l'extraction méthanolique de *Clematis cirrhosa*.

##### 1.2.2. Préparation de la gamme de concentrations testées de l'extrait de *Clematis cirrhosa*

Après avoir obtenu un extrait entièrement sec, une concentration mère de 10 mg/ml a été préparée à partir de laquelle différentes concentrations filles ont été testées (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml) (Figure 8).

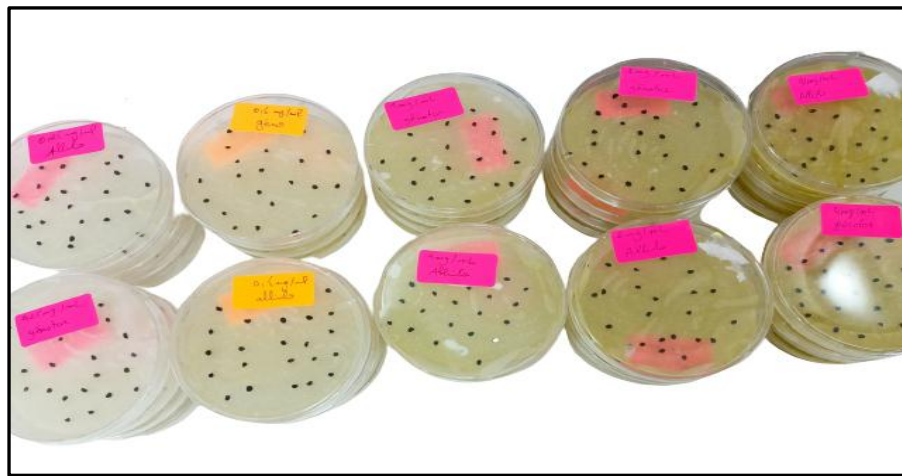


**Figure 8.** Les concentrations préparées de l'extrait du *Clematis cirrhosa* dans le laboratoire.

### 1.2.3. Test allélopathique

Les graines de l'*Allium cepa* ont été utilisées comme plante modèle pour évaluer le potentiel allélopathique de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Clematis cirrhosa*. L'expérience a suivi un plan expérimental comprenant quatre répétitions. Chaque répétition correspond à une boîte de Pétri (9 cm de diamètre) contenant 25 graines. Les graines ont été disposées sur du papier filtre humidifié avec 5 ml de l'extrait. Pour cela cinq concentrations de l'extrait (0,25, 0,5, 1, 2 et 4 mg/ml) ont été évaluées.

De l'eau distillée a été utilisée comme témoin négatif. Après le traitement, les boîtes ont été maintenues à  $24 \pm 2$  °C dans une chambre de croissance à l'obscurité pendant 7 jours de l'expérience (Narwal et al., 2008). Le papier filtre était maintenu humide en ajoutant 5 ml d'eau distillée lorsque nécessaire (Figure 9).



**Figure 09.** Test allélopathique sur les graines de l'*Allium cepa* avec les différentes concentrations de l'extrait de *Clematis cirrhosa*.

Le pourcentage de graines germées a été noté après 24 heures d'exposition aux traitements, tandis que la croissance de la partie racinaire a été déterminée à l'aide d'une règle après chaque 24 heures d'exposition à l'extrait pendant 5 jours, conformément à Narwalet al. (2008). Trois paramètres ont été évalués : pourcentage de germination (PG), le temps moyenne de germination (TMG), croissance des racines en mm, selon Aragão et al., (2015).

- **Le taux de germination (TG)**

$$\text{TG}(\%) = \frac{\text{nombre de graines germées}}{\text{Graines totales}} \times 100$$

- **Le temps moyen de germination TMG**

$$\text{TMG} = \frac{\sum T_i N_i}{s}$$

Ti= nombre de jours après le début de l'expérience.

Ni= nombre de grains germé ce jour-là.

S= nombre total de grains germées.

### 1.2.4. Le test de cytotoxicité et génotoxicité

Pour évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité de l'extrait de *Clematis cirrhosa*, des graines de l'*Alliumcepa* ont été exposées dans les mêmes conditions que celles décrite précédemment (test alléopathique), toutes les graines ayant des racines dont la taille varie de 1-1.5 cm ont été récoltées et fixées dans une solution d'éthanol : acide acétique, puis stockées à 4 °C pendant au moins 24 heures.

Les lames ont été préparées par la technique de l'écrasement. Le noyau et les chromosomes ont été colorés avec le réactif de Schiff (30 min à l'obscurité, à température ambiante) et les cellules ont été colorées avec 2% d'acétocarmin.

Chaque lame a été préparée en utilisant un méristème traité, et cinq lames ont été évaluées par traitement. 600 cellules ont été évaluées par lame, pour un total de 3000 cellules méristématiques observées par traitement.

Les différentes phases de division mitotique ainsi que les éventuelles altérations chromosomiques et nucléaires ont été observées et enregistrées. Les paramètres de cytotoxicité tels que l'indice mitotique (IM), et l'indice de phase (prophase, métaphase, anaphase et télophase) ont été obtenus selon Aragão et al., (2015).

$$\bullet \text{ IM (\%)} = \frac{\text{Nombre totale de cellules en division}}{\text{Nombre de cellules examinées}} \times 100$$

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

Pour les paramètres de génotoxicité on a l'indice d'altérations chromosomiques (IA) qui a été obtenu selon Aragão et al., (2015).

$$\bullet \text{ IA (\%)} = \frac{\text{Nombre totale d'aberrations chromosomique}}{\text{Nombre totale des cellules examinées}} \times 100$$

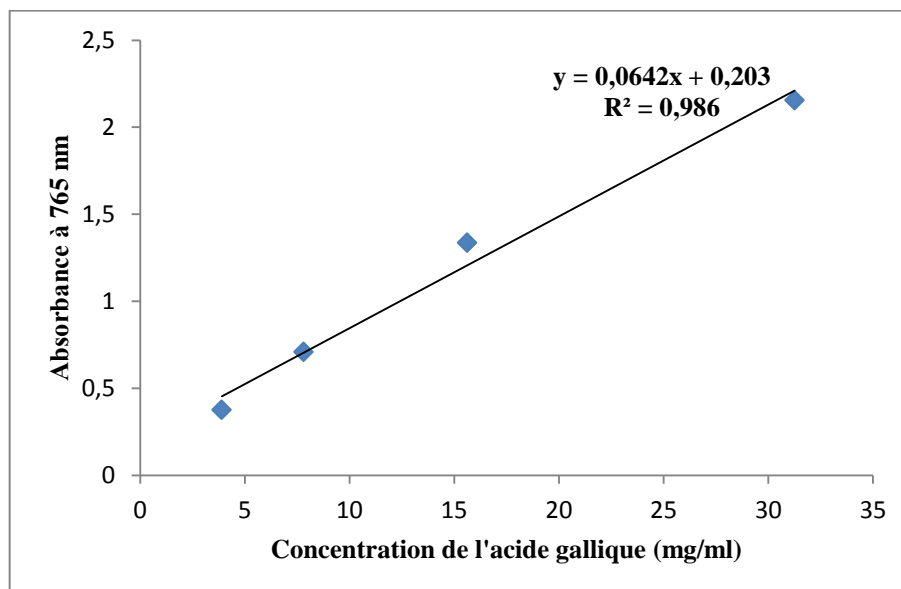
### 1.2.5. L'analyse phytochimique

#### a. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu.

Pour cela, 200 µl d'extrait à différentes concentrations (0,5 mg/ml, 1 mg/ml) ont été mélangés avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué à un rapport de 1 :10. Après 4 minutes, 800

$\mu\text{l}$  de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 7,5 %) ont été ajoutés au mélange. Le mélange a ensuite été incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 heures. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 765 nm par rapport à un blanc en utilisant un spectrophotomètre UV (Maity et *al.*, 2013). Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait) (Figure 10).

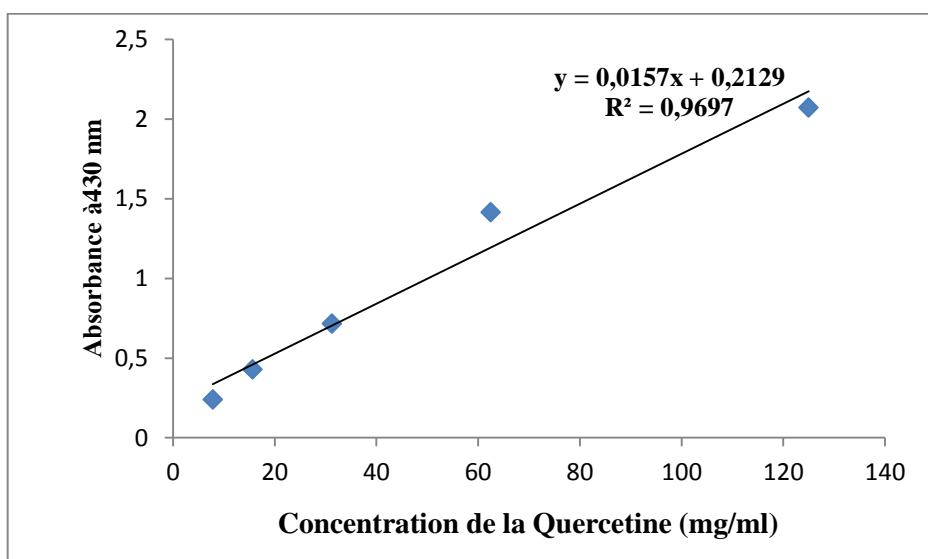


**Figure 10.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### b. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium. Pour cela, 1 ml d'une solution d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ , 2 %) a été ajouté à 1 ml de l'extrait à deux concentrations (0,5 mg/ml, 1 mg/ml).

Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante, ensuite la lecture a été effectuée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un blanc a été utilisé en utilisant 1 ml de ( $\text{AlCl}_3$  + 1 ml de méthanol) (Turkoglu et *al.*, 2007). Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de la Quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait) (Figure 11).



**Figure 11.** Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

**c. L'activité antioxydante**

L'activité anti-radicalaire de l'extrait a été évaluée spectrophotométriquement en utilisant la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH. Cette méthode est basée sur le principe selon lequel plus la perte de couleur de la solution de DPPH est rapide, plus le composé testé est considéré comme un antioxydant puissant (Belmokhtar, 2015). Le radical DPPH (DPPH<sup>•</sup>) est réduit par un donneur d'hydrogène (AH) pour former le radical DPPH-H (A<sup>-</sup>).

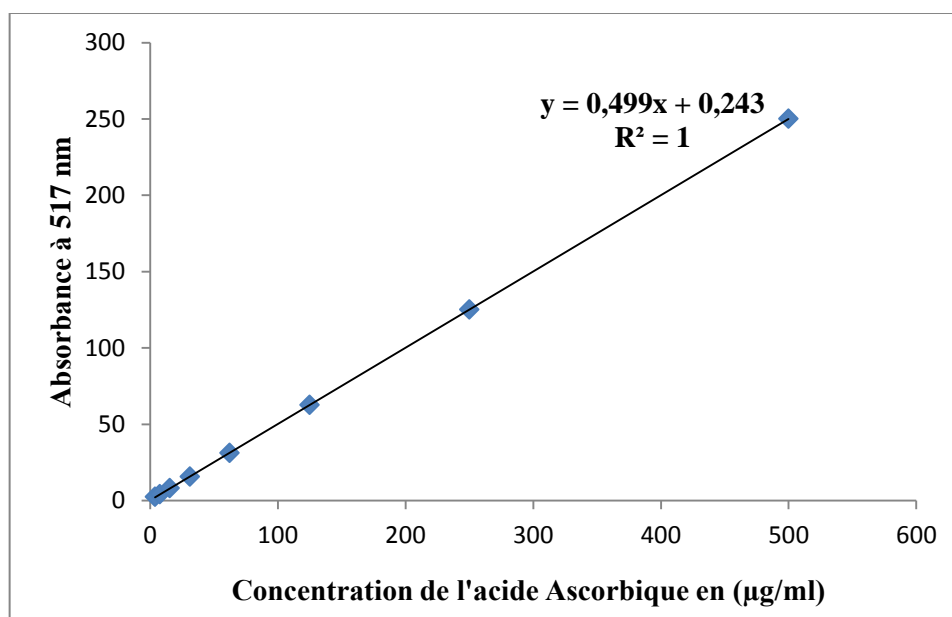
Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'extrait testé ainsi que de l'acide ascorbique ont été ajoutés à 1950 µl de solution de DPPH préparée dans du méthanol. Un blanc a été préparé en ajoutant 50 µl de méthanol à 1950 µl de la solution de DPPH. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH est établi par l'équation suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire (\%)} = \frac{(\text{Ab contrôle} - \text{Ab échantillon})}{\text{Ab contrôle}} \times 100$$

Ab contrôle : l'absorbance du blanc.

L'activité antioxydante de l'extrait testé a été exprimée en IC<sub>50</sub>, qui est défini comme la concentration (en µg/ml) nécessaires pour inhiber 50% des radicaux du DPPH, le IC<sub>50</sub> de l'extrait a été comparée par la suite au IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique (Figure 12).

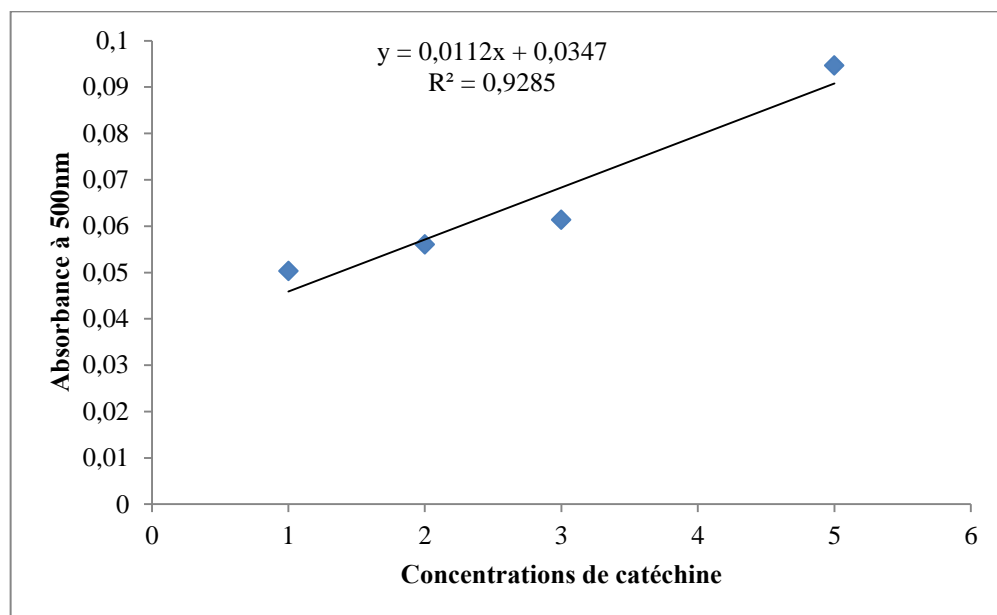


**Figure 12.** Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique.

### d. Dosage des tanins condensés

La quantification des tanins condensés a été déterminée selon la méthode de Schofield et *al*, (2001). Cette technique est basée sur la formation d'un complexe rouge entre la vanilline et les tannins. 3 ml d'une solution de vanilline (4%) et 1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré ont été ajoutés à 400µl de chaque échantillon ou standard.

Après 15 minutes d'incubation l'absorbance est lue à 500 nm. La concentration des tanins condensés a été déterminée à partir d'une gamme d'étalonnage établie par la catéchine (0-400 µg/ml) et les résultats sont exprimés en microgramme équivalents de la catéchine par milligramme d'extrait (µg ECT/mg d'extrait). (Figure 13).



**Figure 13.** Courbe d'étalonnage de catéchine.

Il faut signaler que toutes les analyses phytochimiques, chaque mesure a été effectuée en triplicate et la valeur finale correspond à la moyenne des trois répétitions pour chaque dosage.

#### 1.2.6. L'analyse statistique

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel (SPSS. 25), les données allélopathiques ont été obtenus à partir de quatre répétitions, alors que les données cytotoxiques et génotoxiques ont été obtenus à partir de cinq répétitions, les résultats ont été exprimés sous la forme de la moyenne  $\pm$  l'écart-type (SD). Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple de Dunnettété utilisée pour comparer les moyennes à  $P \leq 0,05$ .

# **Résultats et discussion**

### 2. Résultats et discussion

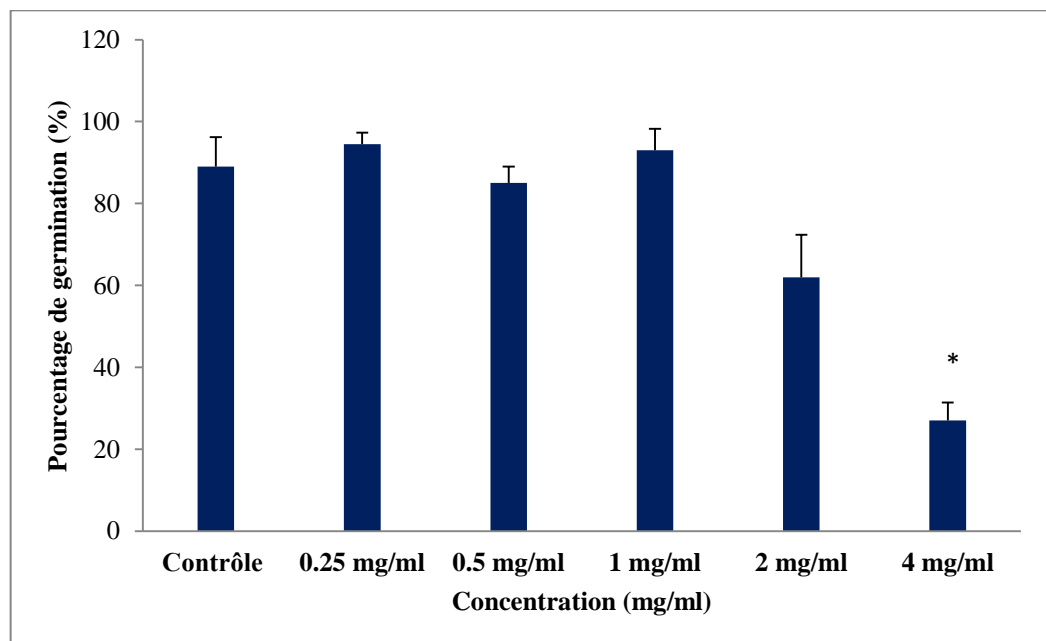
#### 2.1. Résultats

##### 2.1.1. Evaluation de l'activité allélopathique de l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa*

###### a. Pourcentage de germination

Les résultats relatifs au pourcentage de la germination illustrés dans la figure 14, ont montré que l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* implique un effet inhibiteur de la germination des graines de l'*Allium cepa*, uniquement à des concentrations plus au moins fortes (2 mg/ml et 4 mg/ml), la réduction du pouvoir germinatif était significative à 4 mg/ml, 27% ( $p < 0.05$ ).

Le pourcentage de germination dans les autres groupes traités avec les concentrations (0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml et 1 mg/ml) était presque identique à celui du contrôle, et même supérieur, la germination maximale a été enregistré à la concentration 0.25 mg/ml et 1 mg/ml dont le pourcentage était respectivement 94% et 93% comparé à celle du contrôle 90%.



**Figure 14.** Pourcentage de germination pour les concentrations avant et après le traitement par l'extrait *Clematis cirrhosa*, \* $p < 0.05$ .

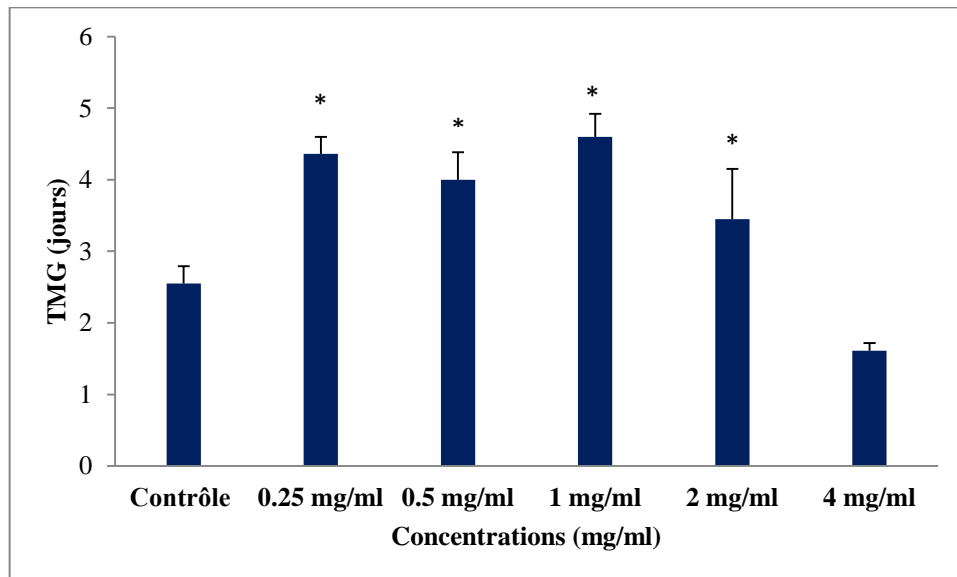
###### b. Temps moyen de germination

Le temps moyen de germination (TMG), la rapidité de la germination était exprimée par la valeur du temps moyen de germination (TMG), c'est-à-dire que plus la valeur du TMG est faible, plus la germination est précoce. L'analyse de variance des données a révélé que l'extrait de *Clematis cirrhosa* a un effet significatif sur le TMG de l'*Allium cepa* ( $P < 0.05$ ).

Le temps moyen de germination a augmenté de 2.55 jours chez le contrôle à 4 jours presque pour les groupes traités avec les concentrations (0.25, 0.5, 1 et 2 mg/ml) de l'extrait aqueux. Cependant une forte diminution du temps moyen de germination de l'ordre de 1.67 jours a été

constaté avec la forte concentration 4 mg/ml, cela est étroitement lié à une forte diminution du nombre de graines germés (Figure 15).

La rapidité (vitesse) de germination des plantes est un paramètre important dans les modèles de compétition entre cultures et mauvaises herbes. Par conséquent, l'utilisation des extraits qui peuvent retarder la germination des graines de mauvaises herbes peut être bénéfique pour les agriculteurs et une bonne alternative aux pesticides.



**Figure 15.** Effet des différentes concentrations de l'extrait de *Clematis cirrhosa* sur le temps moyen de germination, \* $p < 0.05$ .

### 2.1.2. Evaluation de l'activité cytotoxique

L'estimation de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux de l'espèce *Clematis cirrhosa* a été réalisée en prenant en considération deux paramètres, à savoir l'élongation racinaire des graines de l'oignon pendant cinq jours ainsi que le taux de division mitotique dans le tissu méristématique des racines de l'oignon.

#### a. L'élongation racinaire

La croissance racinaire des graines de *Allium cepa* a été suivie après avoir été traitées avec différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* et cela pendant cinq jours. Les résultats indiqués dans le tableau 2 montrent une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) de la croissance racinaire des graines de l'oignon avec toutes les concentrations testées dès le quatrième et cinquième jour de traitement.

Notant que cette diminution est supérieure à la moitié par rapport au contrôle. La longueur maximale atteint 10 mm au cinquième jour pour le groupe contrôle, sinon pour les groupes traités avec les concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/ml), la longueur racinaire moyenne au cinquième jour est de l'ordre de 4 mm presque. Parmi toutes les concentrations testées la concentration 2 mg/ml a montré la valeur la plus faible (3.15 mm).

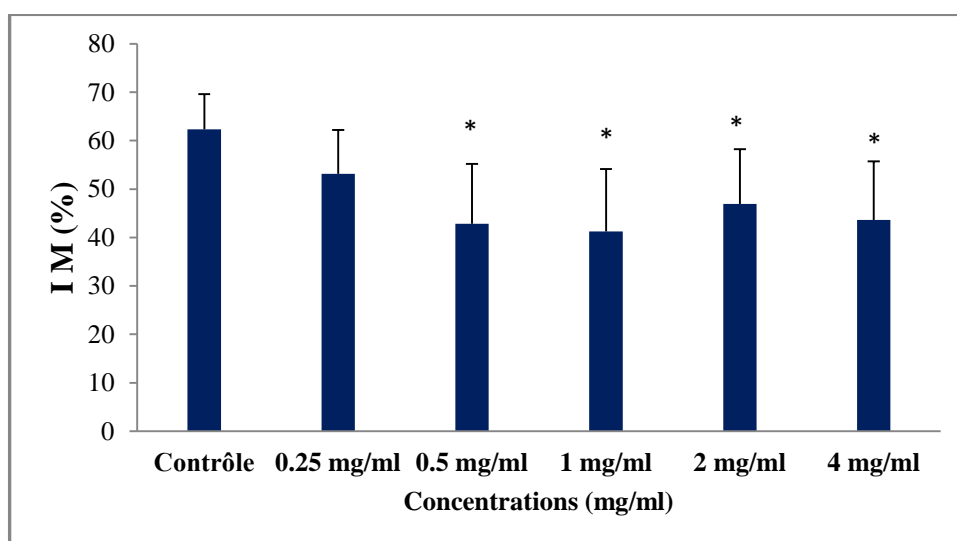
**Tableau 2.** Variation de la longueur racinaire selon les concentrations testées de l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa*, \*\*p<0.01.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
<b>Contrôle</b>	1.5±0.5	1.57±0.05	3.58±0.37	7.04±0.95**	10.01±0.86**
<b>0.25 mg/ml</b>	0±0	0.75±0.21	1.21±0.20	1.57±0.11**	4.37±0.26**
<b>0.5 mg/ml</b>	0±0	0.37±0.30	1.25±0.3	1.56±0.11**	4.97±0.52**
<b>1 mg/ml</b>	0±0	0.56±0.45	1.36±0.34	1.7±0.22**	3.84±0.19**
<b>2 mg/ml</b>	0±0	0±0	2.75±0.6	2.88±0.89**	3.15±0.41**
<b>4 mg/ml</b>	0±0	1.5±0.6	1.87±0.5	3.18±0.45**	4.04±0.33**

**b. L'indice mitotique**

L'indice mitotique (IM%) s'exprime par le nombre total de cellules en division dans le cycle cellulaire, cet indice est utilisé comme paramètre pour évaluer la cytotoxicité d'un composé donnée, soit par diminution ou par augmentation.

Dans notre cas l'indice mitotique est utilisé pour déterminer la cytotoxicité de l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* sur le cycle cellulaire de l'*Allium cepa*. Par rapport au témoin négatif (IM=62.38), l'extrait testé a induit une diminution de la division cellulaire dans le tissu méristématique de l'*Allium cepa*, cette diminution est relativement faible à la plus faible concentration 0.25 mg/ml (53.14%, non significative), cependant cette diminution devient significative (p<0.05) à partir de la concentration 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml et 4 mg/ml, dont l'indices mitotiques sont respectivement 42,81%, 41,25%, 46.92% et 43.60% (Figure 16).



**Figure 16.** L'indice mitotique pour les différentes concentrations de l'extrait *Clematis cirrhosa*.

L'analyse cytogénétique des différentes phases de la division cellulaire a montré que l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa*, a affecté le déroulement régulier de certaines phases également (Tableau 3), de sorte que la fréquence de la métaphase chez les cellules méristématiques a diminué considérablement (diminution hautement significative,  $p < 0.01$ ) à toutes les concentrations testées vers une moyenne de 3% par rapport au groupe contrôle (9,69%).

Une légère diminution, non significative ( $p > 0.05$ ) de la fréquence des cellules en prophase et télophase a été notée à toutes les concentrations par rapport au groupe contrôle. Cette diminution est accompagnée par une augmentation de la fréquence des cellules interphasiques notamment à la concentration 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml et 4 mg/ml.

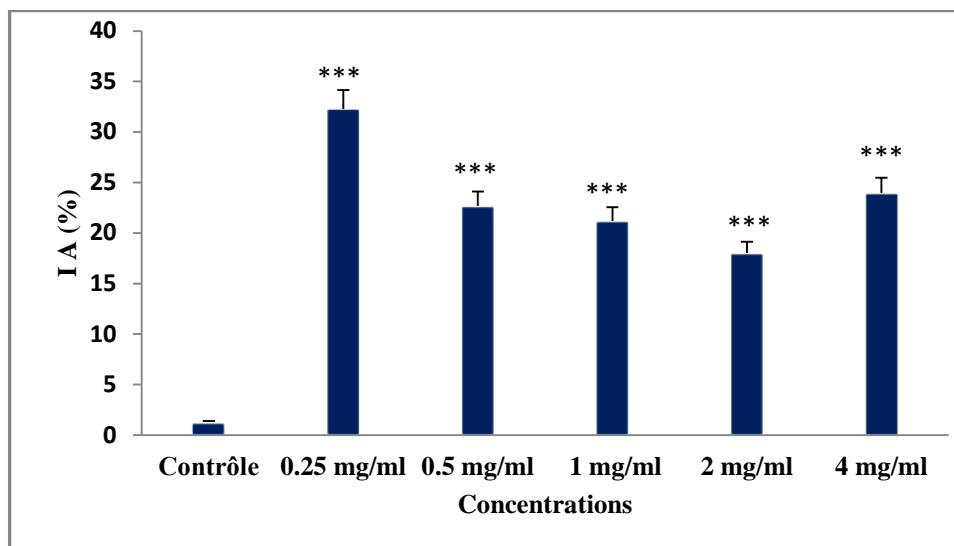
**Tableaux 3.** L'effet de l'extrait de *Clematis cirrhosa* sur la division cellulaire de *Allium cepa*, \* $p < 0.05$ .

	Interphase	Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase	IM (%)
<b>Contrôle</b>	37.66±3.01	21.66±6.26	9.69±1.79	8.53±1.86	22.43±4.53	62.32±7.25
<b>0.25 mg/ml</b>	46.83±8.91	20.36±3.76	3.36±1.00**	10.06±2.42	19.36±5.42	53.15±9.06
<b>0.5 mg/ml</b>	57.16±5.52*	14.46±2.77	2.69±2.12**	8.13±3.16	17.53±4.39	42.81±12.38
<b>1 mg/ml</b>	58.2±14.88*	13.92±5.41	3.26±1.78**	10.26±5.37	13.79±5.52	41.25±12.91
<b>2 mg/ml</b>	54.06±11.22*	18.09±5.37	2.16±1.85**	6.99±0.95	19.66±5.91	46.92±11.28
<b>4 mg/ml</b>	56.39±4.55*	15.13±1.63	2.92±1.28**	8.59±2.45	16.95±2.90	43.60±12.10

### 2.1.3. Evaluation de l'activité génotoxique

#### a. L'indice d'aberration chromosomique

L'examen microscopique du tissu méristématique des racines d'*Allium cepa* L a révélé que, par rapport au contrôle, l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* a induit plusieurs anomalies mitotiques. L'indice d'aberration chromosomique a augmenté fortement (augmentation très hautement significative, ( $p < 0.001$ )) à toutes les concentrations testées (Figure 18), cependant l'augmentation n'est pas vraiment dépendante la concentration. De sorte que l'indice d'aberration le plus élevé a été enregistré à la concentration la plus faible 0.25 mg/ml, cela est parfaitement corrélé avec le pourcentage des cellules en division, ou la concentration 0.25 mg/ml a montré le taux le plus élevé après le contrôle.



**Figure 17.** Indice d’aberration chromosomique pour toutes les différentes concentrations avant et après traitement de *Clematis cirrhosa* sur l’*Allium cepa*, \*\*\*p<0.001.

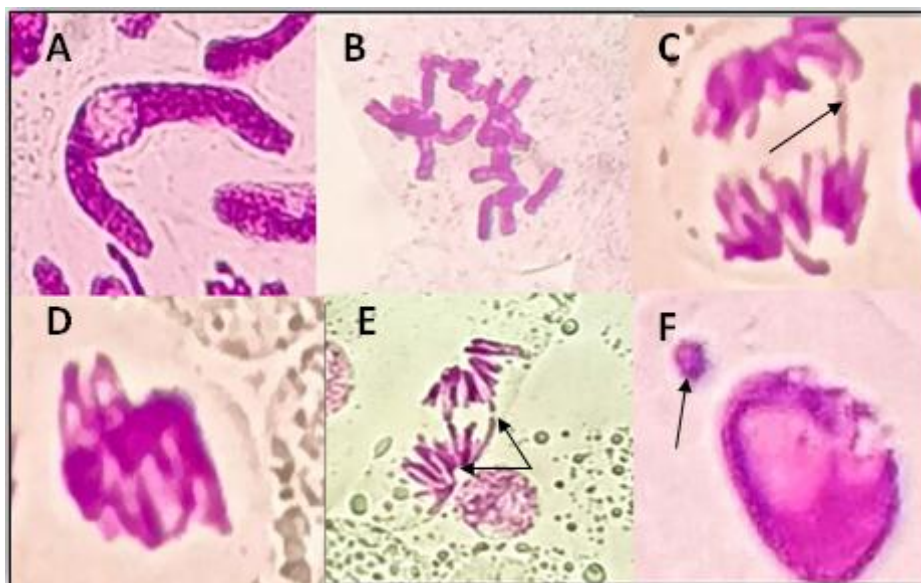
**b. Types d’aberrations chromosomiques détectées**

C’est un paramètre à travers lequel tous les types d’aberration peuvent être identifiés. L’analyse cytogénétique des cellules d’*Allium cepa* après 24h de traitement par l’extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* a montré qu’il existe de nombreux types d’aberration chromosomique, néanmoins une certaine connaissance en cytogénétique est absolument nécessaire pour pouvoir identifier les différents types d’anomalies rencontrées.

Plusieurs types d’anomalies chromosomiques ont été rencontrés dans notre étude, tels que le pont chromosomique, les chromosomes collants, le micronoyau, le c-mitose, le chromosome vagabond auxquelles s’ajoutent des lésions nucléaires tels que les noyaux allongés. Cependant les chromosomes collants (Adhésion chromosomique) et les noyaux allongés représentent le plus grand pourcentage d’aberration chromosomique dans les cellules d’*Allium cepa* (Tableau 4) par rapport au contrôle ou les aberrations chromosomiques sont presque inexistantes.

**Tableau 4.** Fréquence des différents types d’aberrations chromosomiques, \*\*\*p<0.001.

	Adhésion chromosomique	Noyaux allongé	Micro noyaux	C mitose	Multi polaire	Télo étoile	Anaphase déséquilibré	Pont Chromosomique	Vagabond	IA (%)
<b>Contrôle</b>	0.33±0.19	0.26±0.4 5	0.13±0.1 2	0±0	0.032±0.0 64	0.098±0.1 3	0.064±0.07	0.098±0.1 3	0.29±0.12	1.30±0.08
<b>0.25 mg/ml</b>	11.6±2.4* **6	44.9±0.8 5***	2.49±1.0 6***	0.96±0.8 7	2.26±0.51	2.62±1.72 ***	1.86±0.66***	3.83±1.0* **4	2.06±1.05 ***	32.30±1.85 ***
<b>0.5 mg/ml</b>	7.19±2.73 ***	3.56±0.7 2***	0.63±0.3 3	1.06±0.7 6	0.99±0.55	3.43±2.03 ***	1.13±1.10***	2.99±1.27 ***	1.69±0.82	22.70±1.41 ***
<b>1 mg/ml</b>	7.09±3.45	3.16±1.5 5***	0.69±0.8 5	0.49±0.6 9	1.49±1.06	1.26±0.80 ***	1.73±1.05***	3.56±1.98 ***	1.69±1.17 ***	21.20±1.35 ***
<b>2 mg/ml</b>	7.03±2.47 ***	2.36±1.0 1***	1.03±0.7 1	0.43±0.5 6	1.39±0.50	1.79±1.40 ***	0.95±0.79	2.23±0.97 ***	0.79±0.60	18.03±1.12 ***
<b>4 mg/ml</b>	7.83±2.08* **	4.33±0.92 ***	1.73±0.81 ***	1.09±0.44	0.83±0.54	1.49±0.59 ***	1.83±1.34***	3.43±1.31 ***	1.39±0.68 ***	23.97±1.52* **



**Figure 18.** Les différentes aberrations observées chez les cellules racinaires d'*Allium cepa* par l'extrait de *Clematis cirrhosa* sous microscope optique (x40). (A) : noyau allongé, (B) : C mitose, (C) : pont chromosomique, (D) : adhésion chromosomique, (E) : Anaphase multipolaire et déséquilibré, (F) : micronoyaux.

### 2.1.4. L'analyse phytochimique de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa*

#### a. Dosages des polyphénols

Les polyphénols totaux de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa* ont été déterminés par le test Folin-Ciocalteu (F-C) en utilisant l'acide gallique comme composé phénolique de référence. Ce test est une méthode colorimétrique rapide et reproductible puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisée dans la gamme étalon.

La courbe de l'acide gallique établie (Figure 10) a permis d'obtenir une estimation approximative des composés phénoliques totaux présents dans un extrait étudié. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. Nos observations indiquent que la plante présente une teneur en polyphénols assez considérable, 115 mg/g (GAE) (Tableau 5).

#### b. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), cette teneur a été exprimée en équivalents Quercétine (Q) en milligrammes par gramme de matière sèche de l'extrait. La courbe d'étalonnage de la Quercétine (Figure 11) a servi pour déterminer la teneur en flavonoïdes. Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que l'extrait contient une quantité de flavonoïdes (0.245 mg EAG/g).

**c. Dosage de tanins**

La teneur en tanins a été déterminée selon la méthode de Schofield et *al*, (2001). Cette technique est basée sur la formation d'un complexe rose entre la vanilline et les tannins, cette teneur exprimée en milligramme équivalent de la catéchine par gramme d'extrait (mg ECT/g d'extrait) (Figure 13). Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que l'extrait contient une quantité considérable en tanins (157.68 mg ECT /g).

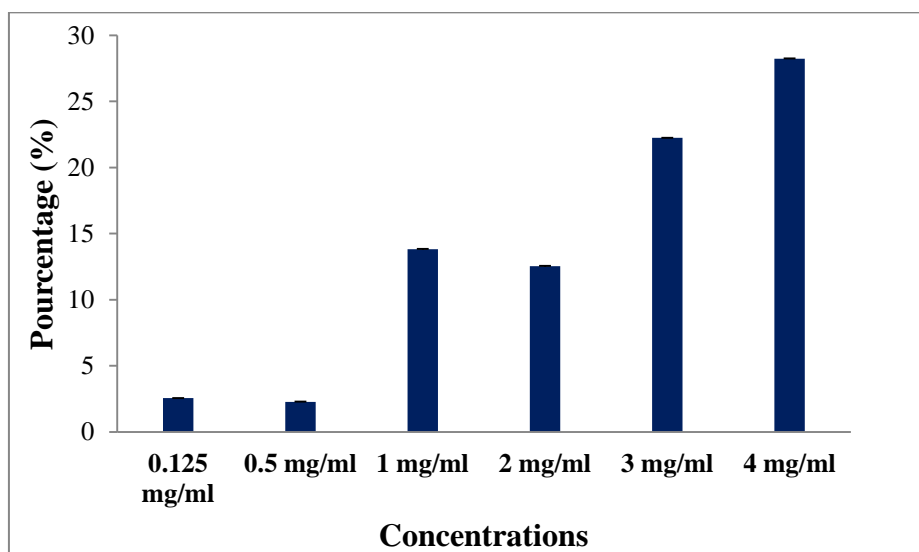
**Tableau 5.** Les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa*.

	<b>Polyphénols totaux mg GAE/g</b>	<b>Total flavonoïdes mg Q/g</b>	<b>Tanins totaux mg CAT/g</b>
<i>Clematis cirrhosa</i>	114,99	0.245	157,68

**d. L'activité antioxydante**

Le test de capture des radicaux DPPH est une méthode largement utilisée et relativement simple pour évaluer l'activité antioxydante. Les molécules antioxydante capturent les radicaux DPPH par un processus de donation d'hydrogène ou d'électrons, et la solution du test DPPH• passe de violet vers le jaune clair en présence des antioxydants.

Concernent l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa* nous avons remarqué que le pourcentage antioxydante augmente en augmentant la concentration, aux faibles concentrations (0.125 mg/ml et 0.5 mg/ml) les valeurs sont presque les mêmes et l'activité antioxydante est très faible. A des concentrations relativement élevées (1 mg/ml et 2 mg/ml) l'activité a augmenté considérablement, à la plus forte concentration (4 mg/ml) nous avons enregistré le pouvoir antioxydante le plus élevée (figure 20).



**Figure 19.** L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa* a des différentes concentrations.

## Résultats et discussion

Le tableau ci-dessous indique la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa* par rapport à l'acide ascorbique, d'une manière générale le pouvoir antioxydante de la plante *Clematis cirrhosa* est très faible par rapport à celui de l'acide ascorbique.

**Tableau 6.** Les valeurs d'IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, et l'APR de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa* par rapport à l'acide ascorbique

	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub>	APR
<i>Clematis cirrhosa</i>	1149.79	0.287	3,479
Acide Ascorbique	2	0,0005	2000

**IC<sub>50</sub>** : Ce dernier représente la concentration inhibitrice de l'extrait à piéger 50% des radicaux libre dans le mélange réactionnel.

**EC<sub>50</sub>** : Concentration effective à 50 %, qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel.

$$EC_{50} = \frac{IC_{50}}{\text{Concentration de DPPH } (\mu\text{g /ml})}$$

**APR** : Le pouvoir anti-radicalaire relatif qui est inversement proportionnel à l'EC<sub>50</sub>. Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydant augmente.

$$APR = \frac{1}{EC_{50}}$$

### 2.2. Discussion

La recherche toxicologique utilise souvent l'*Allium cepa* comme modèle végétal représentatif. Comparé à d'autres bioessais tels que le test des micronoyaux (MN), le test d'Ame et les lignées cellulaires, le test d'*Allium cepa* est considéré comme plus précis, fiable et efficace. Cela est dû aux données moléculaires fournies par l'*Allium cepa*, qui révèlent comment diverses substances toxiques affectent la structure chromosomique.

#### 2.2.1 Allélopathie

En considérant l'activité de l'extrait aqueux des cinq concentrations testées sur la germination des graines de l'*Allium cepa*, une réduction du taux de germination a été observée, et donc une inhibition de la germination par rapport au contrôle a été constatée à partir de la concentration de 0,5 mg/ml. Le temps moyen de germination a augmenté en augmentant la concentration de l'extrait.

Parmi plusieurs paramètres macroscopiques mesurés lors des tests allélopathiques, nous avons choisi deux paramètres, le taux de germination et le temps moyen de germination des graines. La germination est considérée comme le critère le moins sensible (Aragão et al., 2017), tandis que la croissance des racines (élongation racinaire) est considérée comme un critère très sensible (Valerio et al., 2007) pour détecter la toxicité des composés allélopathiques.

Selon Rajjou et al., (2012), la germination dépend de nombreux facteurs biochimiques et moléculaires, activation du métabolisme embryonnaire dans les graines, qualité de l'ARN et intégrité de l'ADN, ainsi que les phytohormones. Cependant, le processus de germination peut être instable en présence d'allélochimiques.

Ces dernières peuvent réduire l'activité des enzymes hydrolytiques ce qui signifie que les graines ne sont pas en mesure de fournir suffisamment d'énergie pour la germination des embryons, ce qui réduit la capacité de germination (Zandi et al., 2018). De plus, les allélochimiques augmentent la vacuolisation cellulaire, accompagnée d'une diminution du nombre de mitochondries, de la densité des ribosomes et des dicaryons (Burgos et al., 2004).

Certains métabolites secondaires végétales influent la germination ou la croissance des plantes par des mécanismes multiples (Einhellig et al., 1985). Les composés phénoliques peuvent être impliqués dans le contrôle de l'activité des hormones végétales. La suppression de la dégradation de l'acide acétique (AA) par différents phénols a ainsi été rapportée par (Lee et al., 1982).

La croissance des racines est basée sur la prolifération cellulaire, et l'exposition aux produits allélochimiques peut gravement affecter la division cellulaire, entraînant un retard de croissance des racines (Tanveer et al., 2012).

### 2.2.2. Indice mitotique

L'indice mitotique est considéré comme un paramètre puissant pour estimer la fréquence de la division cellulaire (Marcano et al., 2004). Le test de l'*Allium cepa* est considéré comme un modèle de référence pour l'évaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité (Lubini et al., 2008, Bagatini et al., 2009).

Cette espèce possède des chromosomes peu nombreux (n=16) de grande taille, qui rendent facile la détection des aberrations chromosomiques et les perturbations de la division cellulaire (Barbério et al., 2011). Il est considéré comme un test rapide et pas cher pour déterminer le niveau de toxicité en prenant en considération trois paramètres : l'inhibition de l'élongation racinaire, l'effet sur l'indice mitotique et l'étude des aberrations chromosomiques.

Outre l'effet négatif direct exercé par l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* sur la croissance racinaire de l'oignon, d'autres effets négatifs sur le développement du cycle cellulaire ont été notés. Une diminution de la fréquence de la division mitotique chez les cellules de l'*Allium cepa* par rapport à celle du groupe contrôle. Cette propriété bioactive est très intéressante en raison du potentiel bioherbicide de ces allochimiques, car la suppression du cycle cellulaire est étroitement liée à l'inhibition du développement.

L'indice mitotique (IM) des cellules méristématiques de l'*Allium cepa*, l'extrait testé a induit une diminution de la division cellulaire dans le tissu méristématique de l'*Allium cepa*, cette diminution est relativement faible à la plus faible concentration 0.25 mg/ml (53.14%, non significative), cependant cette diminution devient significative ( $p < 0.05$ ) à partir de la concentration 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml et 4 mg/ml. Cette diminution est corrélée positivement avec l'augmentation de la fréquence des cellules interphasiques.

On a observé une diminution de l'indice mitotique dépendante de la concentration, suggérant que l'extrait aqueux inhibe la division cellulaire de l'*Allium cepa* de manière mitodépressive. Les agents mitodépresseurs présents dans l'extrait ont été démontrés pour inhiber le cycle cellulaire de plusieurs façons, notamment en bloquant la phase G1 et, par conséquent, la synthèse de l'ADN, la phase G2 et, par conséquent, l'entrée en mitose, ainsi que la synthèse des nucléoprotéines (El-Ghamery et al., 2000). Une diminution de l'indice mitotique peut être causée par un obstacle à la prophase, un arrêt dans une ou plusieurs phases mitotiques, ou un ralentissement du déplacement des chromosomes pendant la mitose, comme suggéré par Christopher et Kapoor (1988).

D'autres auteurs ont suggéré qu'une diminution de la fréquence de la division cellulaire peut également être dû à une altération de la synthèse des nucléoprotéines et à un déficit en ATP, empêchant ainsi l'allongement du fuseau, la dynamique des microtubules et la motilité des chromosomes (Paul et al., 2013).

A partir des résultats obtenus ici nous suggérons que les concentrations testées de l'extrait de *Clematis cirrhosa* ont des effets inhibiteurs et mito-dépressifs sur la croissance des racines et la division cellulaire de l'*Allium cepa* et peuvent empêcher la synthèse d'ADN et par conséquent réduire le nombre de cellules en division dans les racines cela revient principalement à la composition biochimique des molécules secondaires qui se trouvent dans l'extrait.

Les effets inhibiteurs de la mitose de certains extraits de plantes y compris la capacité de bloquer la synthèse de l'ADN et des protéines nucléiques, ont été déjà rapportés (Schulze et Kirschner, 1986).

Ces résultats concordent avec de nombreuses recherches qui ont révélé des effets cytotoxiques et génotoxiques de d'autres espèces du genre *Clematis* à savoir : *Clematis flammula* provoquant des effets négatifs similaires à celle de *Clematis* sur la croissance des racines et la prolifération cellulaire (Alloche et Atik, 2014).

Plusieurs extraits de plantes médicinales ont vu leur potentiel de posséder des propriétés cytotoxiques et antiprolifératives vérifiées. Ces caractéristiques sont souvent exploitées pour bloquer la prolifération incontrôlée des cellules tumorales (Konuk *et al.*, 2007 ; Barman *et al.*, 2020 ; Barman *et al.*, 2021 ; Roy *et al.*, 2021).

### 2.2.3. Indice d'aberration chromosomique

Le test d'*Allium cepa*, a été utilisé pour détecter les signes de génotoxicité impliqués par l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa*, ce test est largement accepté pour évaluer le potentiel génotoxique des produits chimiques environnementaux en raison de sa grande sensibilité et de son excellente corrélation avec les systèmes de test *in vitro* utilisant les lignées cellulaires animales (El-Shabbaby *et al.*, 2003 ; Teixeira *et al.*, 2003 ; Ventura *et al.*, 2008).

Dans notre cas plusieurs types d'aberrations chromosomiques sont pris en compte dans les différentes phases de la division cellulaire (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Les aberrations chromosomiques sont des changements du nombre et de la structure des chromosomes résultant d'une rupture ou d'un échange de matériel chromosomique (Olorunfemi et Ehwre, 2011).

D'après les résultats obtenus l'adhésion chromosomique (Stickness) et les noyaux allongés représentent le plus grand pourcentage d'aberration chromosomique dans les cellules d'*Allium cepa* par rapport au contrôle où les aberrations chromosomiques sont presque inexistantes et autres aberrations chromosomiques (pont chromosomique et le C-mitose).

Les altérations chromosomiques structurales peuvent être induites par plusieurs facteurs, tels que les ruptures d'ADN, l'inhibition de la synthèse de l'ADN et la réplication de l'ADN altéré (Albertini *et al.*, 2000).

D'après les chercheurs, l'adhésion chromosomique (Stickness) est définie comme étant des agglutinations de chromosomes dues à la dégradation ou à la dépolymérisation de l'ADN qui ont comme conséquence un aspect collant de chromosomes (Souguir *et al.*, 2008).

Les chromosomes collants peuvent être interprétés comme un résultat de la dépolymérisation de l'ADN, la dissolution partielle des nucléoprotéines, la rupture et l'échange d'unité de base de chromatides et le décapage du revêtement protéiques de l'ADN dans les chromosomes (Abdel Migid et Abdelrahman, 2013).

Les ponts de chromatine pourraient se produire au cours de la translocation et l'échange de chromatides inégale et provoquent des mutations structurelles chromosomiques (Borboa et Delatorre, 1996).

La présence de C-mitose indique des effets sur l'organisation de la chromatine, qui peut être liée à un déséquilibre des protéines responsables de la structure de la chromatine nucléaire (Kuraset *al.*, 2006). La formation de micronoyaux implique une perte de matériel génétique et une rupture de l'ADN, ce qui signifie à un effet clastogène ou aneugène (Sudhakar *et al.*, 2001).

Ces résultats concordent avec de nombreuses recherches qui ont examiné les effets des différentes plantes médicinales (Bidau *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* à un effet cytotoxique et génotoxique. Les activités génotoxique et cytotoxique des extraits de plantes sont probablement dus à la présence des composés phénoliques dans les extraits interférant avec les protéines du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN (Edziri *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012).

### 2.2.4 Dosages des polyphénols

Les résultats ont révélé que, l'extrait est riche en composés phénoliques, avec une teneur considérable de  $114,99 \pm 2,34$  mg/g(GAE). Nos résultats sont cohérents avec ceux présentée par Mostafa *et al.* (2018) concernant la teneur en polyphénols de l'espèce *Clematis brachiata* (135,11 mg/g).

Les composés phénoliques naturels sont de puissants antioxydantes qui peuvent protéger contre et ralentir l'apparition de maladies dégénératives telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, les maladies coronariennes et même le processus de vieillissement lui-même (Rufino *et al.*, 2011).

Selon Silva *et al.* (2010), les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, peuvent également présenter des activités allélopathiques, entraînant des effets négatifs sur la germination des graines, l'élongation des racines et même la division cellulaire (Basile *et al.*, 2000).

Des composés tels que les tanins, les acides phénoliques ont été décrits comme responsables de l'inhibition de l'action de la gibbérelline dans la germination en provoquant la précipitation des hydrolases ( $\alpha$ -amylase), responsables de la dégradation de l'amidon et des sucres pendant ce processus (Saleh *et al.*, 2015).

De plus, polyphénols et les tanins peuvent bloquer les sites d'action des gibbérellines (Li et Gao, 2011). La présence des tanins et des polyphénols dans l'extrait de *Clematis cirrhosa* pourrait

largement expliquer les effets inhibiteurs sur la germination ainsi que l'effet cytotoxique et génotoxique observés sur les cellules de l'*Allium cepa* observés dans cette étude.

### 2.2.5. L'activité antioxydant

Le test du radical DPPH a révélé qu'un extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa* possède une activité antioxydante, attribuable à la présence de composés phénoliques, cependant le  $IC_{50}=1149,796 \pm 105,146 \mu\text{g/ml}$  est largement faible à celui de l'acide ascorbique ( $IC_{50}= 2 \pm 0,01\mu\text{g/ml}$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de Kirby et Schmidt, (1997) et (Atmani et *al.*, 2009) qui ont montré des valeurs élevées de l' $IC_{50}$  de l'espèce *C. armandii* et *C. flammula* impliquant une activité antioxydante relativement faible.

# **Conclusion**

### Conclusion

La présente étude a révélé que l'extrait de *Clematis cirrhosa* avait des effets allélopathiques et délétères significatifs sur les cellules de l'oignon. Cet extrait contient des substances bioactives, notamment des polyphénols, les flavonoïdes, et les tanins qui semblent jouer un rôle essentiel dans l'inhibition et le retardement de la germination de *Allium cepa*, notamment à des concentrations élevées (1, 2 et 4 mg/ml).

Ces propriétés prometteuses pourraient être utilisées en agriculture pour développer des bioherbicides (alternative des pesticides artificiels) efficaces dans le contrôle de mauvaises herbes.

De plus, des études ont démontré que l'extrait de *Clematis cirrhosa* est cytotoxique et génotoxique significatifs ( $p < 0.001$ ) à toutes les concentrations testées (0.25, 0.5, 1, 2, et 4 mg/ml) sur *Allium cepa*, ces effets se manifestent par une inhibition de la croissance des racines, une diminution de l'indice mitotique, ainsi que par l'induction d'aberrations chromosomiques et même des lésions nucléaires manifestés par des noyaux allongés. Ses effets cytotoxiques et génotoxiques sont souvent liés à des propriétés antitumorales et souvent exploitées dans le traitement des cancers.

Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier et caractériser précisément les substances bioactives responsables de ces effets cytotoxiques et inhibiteurs. Comprendre la nature spécifique de ces composés pourrait permettre une utilisation plus efficace de leur potentiel thérapeutique.

# Résumé

## Résumé

L'extrait de *Clematis cirrhosa* a été étudié afin d'analyser son teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes, son activité de piégeage des radicaux libres DPPH, son activité allélopathique, cytotoxique et génotoxique. La teneur totale en phénols (méthode de Folin-Ciocalteu) s'est révélée être 115 mg EAG/g. La teneur totale en flavonoïdes (méthode du Chlorure d'aluminium) a montré que la teneur totale en flavonoïdes est 0.245 mg EQ/g. La teneur en tanins 157,68 mg ECT/g. L'activité antioxydante a été déterminée en utilisant un test de piégeage des radicaux libres DPPH. L'extrait méthanolique de l'espèce a montré une activité antioxydante modérée. L'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* a montré un effet inhibiteur pour la germination et l'allongement des racines de l'*Allium cepa*. De plus, cet extrait a également inhibé l'élongation racinaire, réduit l'indice mitotique et augmenté l'indice d'aberration chromosomique chez l'*Allium cepa*. Des altérations chromosomiques telles que la C-mitose, l'adhésion chromosomique (Stickness), le pont chromosomique, le chromosome vagabond, le micronoyau ainsi que les noyaux allongés ont été observées dans les cellules de l'oignon exposées à cet extrait. Ces résultats suggèrent que les extraits aqueux et méthanolique de *Clematis cirrhosa* contiennent des composés aux propriétés allélopathiques et cytotoxique. Ces propriétés peuvent être utilisées comme l'industrie des biopesticides et dans la fabrication des produits pharmaceutiques contre les cellules cancéreuses.

## Mots clé :

*Clematis cirrhosa*, *Allium cepa*, cytotoxique, génotoxique, allélopathique, indice mitotique, indice d'aberration chromosomique, activité antioxydante, extrait méthanolique, extrait aqueux, DPPH.

## **Abstract**

*Clematis cirrhosa* extract was studied for total polyphenol and flavonoid content, DPPH free radical scavenging activity, allelopathic, cytotoxic and genotoxic activity. Total phenol content (Folin-Ciocalteu method) was 115 mg EAG/g. Total flavonoid content (aluminum chloride method) showed 0,245 mg EQ/g. Tannin content 157.68 mg CAT/g. Antioxidant activity was determined using a DPPH free radical scavenging assay. The methanolic extract of the species showed moderate antioxidant activity. The aqueous extract of *Clematis cirrhosa* showed an inhibitory effect on the germination and elongation of *Allium cepa* roots. In addition, this extract also inhibited root elongation, reduced the mitotic index and increased the chromosomal aberration index in *Allium cepa*. Chromosomal alterations such as C-mitosis, chromosomal stickiness, chromosomal bridging, stray chromosome, micronucleus and elongated nuclei were observed in onion cells exposed to this extract. These results suggest that aqueous and methanolic extracts of *Clematis cirrhosa* contain compounds with allelopathic and cytotoxic properties. These properties can be used as biopesticides and in the manufacture of pharmaceutical products against cancer cells.

## **Keywords:**

*Clematis cirrhosa*, *Allium cepa*, cytotoxic, genotoxic, allelopathic, mitotic index, chromosomal aberration index, antioxidant activity, methanolic extract, aqueous extract, DPPH.

## ملخص

تمت دراسة مستخلص *Clematis cirrhosa* لتحليل محتواه الكلي من البوليفينول والفلافونويد ، ونشاطه في إزالة الجذور الحرة DPPH ، ونشاطه الأليوباثي ، والسمي للخلايا والسموم الجينية. تم العثور على محتوى الفينول الكلي (طريقة Folin-Ciocalteu) ليكون 115 مجم EAG / جم. أظهر محتوى الفلافونويد الكلي (طريقة كلوريد الألومنيوم) أن محتوى الفلافونويد الكلي هو 245.24 ميكروغرام EQ / جم. محتوى التانين 157.68 مجم CAT / جم. تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة باستخدام مقياس الكسح الجذور الحرة DPPH. أظهر المستخلص الميثانولي لأنواع نشاطاً معتدلاً مضاداً للأكسدة. أظهر المستخلص المائي لـ *Clematis cirrhosa* تأثيراً مثبطاً لإنبات وإطالة جذور *Allium cepa*. بالإضافة إلى ذلك ، أدى هذا المستخلص أيضاً إلى تثبيط استطالة الجذر ، وتقليل مؤشر الانقسام الخيطي وزيادة مؤشر انحراف الكروموسومات في *Allium cepa*. لوحظت تغيرات في الكروموسومات مثل الانقسام C ، الالتصاق الكروموسومي ، الجسر الكروموسومي ، الكروموسوم المتشرد ، النواة الصغيرة وكذلك النوى الممدودة في خلايا البصل المعرضة لهذا المستخلص. تشير هذه النتائج إلى أن المستخلصات المائية والميثانولية من *Clematis cirrhosa* تحتوي على مركبات ذات خصائص اليلوباثية والسمية الخلوية. يمكن استخدام هذه الخصائص كصناعة مبيدات حيوية وفي تصنيع المستحضرات الصيدلانية ضد الخلايا السرطانية

## الكلمات المفتاحية:

*Clematis cirrhosa* ، *Allium cepa* ، سام للخلايا ، سام للجينات ، الاليلوباثي ، مؤشر الانقسام ، مؤشر انحراف الكروموسومات ، نشاط مضادات الأكسدة ، مستخلص الميثانول ، المستخلص المائي ، DPPH

# **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

- 1) **Abdel Migid HM, Abdelrahman HMM. 2013.** Phyto-genotoxicity assessment of sewagewater for agriculture applications. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 4: 511-529.
- 2) **Ahou Kouame J.** Etudes des propriétés cytotoxiques et antiradicalaires d'extraits de feuilles et de Galles de Guiera Senegalensis J.F. Gmel (Combretaceae). Thèse de doctorat. Pharmacie. Université d'Ouagadougou. 2009, 132 p.
- 3) **Alaoui A, Laaribya S. 2017.** Etude ethnobotanique et floristique dans les communes rurales Sehoul et Sidi-Abderrazak (cas de la Maamora-Maroc Septentrional). Nature et Technologie. 9(2):15-24.
- 4) **Albertini D, Anderson GR, Douglas L, Hagmark K, Hemmink F, Merlo AT, Natarajan H, Norppa DE, Shuker R, Tice MD, Water A, Aitio. 2000.** IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, Mutat. Res. 463 : 111–172.
- 5) **Alloche K et Atik N. 2014.** Activité génotoxique et cytotoxique des extraits de *Clematis flammula* et *Cistus albidus*. Biochimie appliquée. Université Abderrahmane Mira. Béjaïa. P :26
- 6) **Allothman M, Bhat R, Karim A A. 2009.** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry. 115(3): 785-788.
- 7) **Aragão F B, Palmieri M J, Ferreira A, Costa AV, Queiroz VT, Pinheiro PF, Andrade-Vieira LF. 2015.** Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). Allelopathy J. 35(2) : 259-272.
- 8) **Aragão FB, Queiroz VT, Ferreira A, Costa AV, Pinheiro PF, Carrijo TT, Andrade-Vieira LF. 2017.** Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploarufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). Rev. Biol. Trop. 65 : 435–443.
- 9) **Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Atmani D. 2009.** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chemistry. 112(2): 303-309.
- 10) **Bagatini MD, Vasconcelos TG, Laughinghouse IV HD, Martin A.F. et Tedesco SB. 2009.** Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. Environmental Contamination Toxicology. 82: 590-592.
- 11) **Barbério A, Voltolini JC, Mello MLS. 2011.** Standardization of bulb and root samplesizes for the *Allium cepa* test. Ecotoxicology. 20: 927-935.
- 12) **Barman M, Roy S, Ray S. 2021.** Mitotic abnormality inducing effects of leaf aqueous extract of *Clerodendrum inerme* Gaertn. on *Allium cepa* root apical meristem cells. Cytologia. 86: 113–118.

- 13) **Barman M, Roy S, Ray S. 2020.** Colchicine like metaphase and cell cycle delay inducing effects of leaf aqueous extract of *Clerodendrum inerme*(L.) Gaertn. in *Allium cepa* root apical meristem cells. *Cytologia*. 85: 197–201.
- 14) **Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Castaldo Cobiانchi R, Vuotto ML, Ferrara L. 2000.** Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* .71: S1–S140.
- 15) **Belmokhtar Z. 2015.** Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retamamonosperma* L. Boiss, intérêt pharmaceutique .these de Doctorat en Sciences .Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf . pp25-34.
- 16) **Benamar H. 2020.** Étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes utilisées en médecines traditionnelles. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem .P 29.
- 17) **Bennetts HW, Uuderwood E J, Shier F L. 1946.** A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian veterinary journal*. 22(1) : 2-12.
- 18) **Beutler L. 2014.** The Rogerson *Clematis* Collection: Where Every Garden Tells a Story; Pacific Horticulture Society: Berkeley, CA, USA.
- 19) **Bidau CJ, Amat AG, Yajia M, Marti DA, Riglos AG, Silvestroni A. 2004.** Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (*Aquifoliaceae*) using the *Allium* test. *Cytologia*. 69(2): 109-117.
- 20) **Blanco JA. 2007.** The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecological modeling*. 209: 65–77.
- 21) **Bodeker G, Ong CK, Grundy, C. 2014.** Who Global Atlas of Traditional, Complementary and Alternative Medicine. World Health Organization.
- 22) **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M .2007.** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28:625-631.
- 23) **Borboa L, Delatorre C. 1996.** The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New phytol*. 134: 481-486.
- 24) **Bouton F. 2005.** Mise en évidence du potentiel allélopathique de la graminée *Festuca Panuculata* dans les prairies subalpines. Rapport de stage de master 01 sciences de la vivant-biodiversité écologie environnement. Univ. Joseph Fourier de biologie :1-18.
- 25) **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Technique et documentation Lavoisier. Paris.

- 26) **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantesmédicinales. Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- 27) **Burgos NR, Talbert RE, Kimk S, Kuky I. 2004.** Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secalecereale*). *Journal of Chemical Ecology*. 30:671-689.
- 28) **Chawla R, Kumar S, Sharma A. 2012.** The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology* 143(1): 116-150.
- 29) **Chohra D, Ferchichi, Cakmak YS, Zengin G, Alsheikh SM. 2020.** Phenolic profiles, antioxidant activities and enzyme inhibitory effects of an Algerian medicinal plant (*Clematis cirrhosa* L.). *South African Journal of Botany* . 132 :164-170.
- 30) **Christopher HB, Kapoor MB. 1988.** The cytogenetic effects of sodium salicylate on the root meristem cells of *Allium sativa* L. *Cytologia*.54: 203–209.
- 31) **Cragg GM, Newman D J. 2013.** Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1830(6) : 3670-3695.
- 32) **Da-Cheng HAO, Pei-Gen XIAO, Hong-Ying MA, Yong P, Chun-Nian HE. 2015.** Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese journal of natural medicines* 13(7): 507-520.
- 33) **DaCheng HAO, XiaoJie GU, PeiGenXIAO ,Peng Y.2013.** Chemical and biological research of *Clematis* medicinal resources. 10: 1120–1129.
- 34) **De Flora S, Izzotti A.2007.**Mutagenesis and cardiovascular diseases Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutat Res*. 621(1-2): 5-17.
- 35) **Du ZZ, Yang XW, Han H, Cai XH, Luo XD. 2010.** A new flavone C-Glycoside from *Clematis rehderiana*. *Molecules*.15:672–679.
- 36) **Edziri H, Mastouri M, Mahjoub A, Anthonissen R, Mertens B, Cammaerts S, GevaertL, Verschaeve L. 2011.** Toxic and mutagenic properties of extracts from Tunisiantraditional medicinal plants investigated by the neutral red uptake, VITOTOX and alkaline comet assays. *South African Journal of Botany*. 77: 703-710.
- 37) **Einhellig FA. 1986.** Mechanisms and modes of action of allelochemicals pp. 171–188, in A.R. Putnam and C.-S. Tang (eds.). *The Science of Allelopathy*. John Wiley & Sons, New York.
- 38) **Einhellig F.A., 1985.** Mechanisms and modes of action of allelochemicals .In“*The Science of Allelopathy*.(Eds.):A.P. PutnamandC.Teng. John Wiley and Sons Publishers.pp. 170-188.
- 39) **El-Ghamery A, El-Nahas AI, Mansour MM. 2000.**The action of Atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Viciafaba*. *Cytologia*. 65: 277–287.

- 40) **El-Shabbaby OA, Migid AHM, Soliman MI, Mashaly IA. 2003.** Genotoxicity screening of industrial waste water using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 6 : 23-28
- 41) **Fenech M, Kirsch VM, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW. 2011.** Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 26(1): 125-132.
- 42) **Ferguson JJ, Rathinasabathi. 2003.** Allelopathy: how plants suppress other plants. Cours D'université de Floride : 3.
- 43) **Fu Q, ZanKe, Zhao M, Zhou S, Shi S, Jiang Y, Tu P. 2010.** Triterpenesaponins from *Clematis chinensis* and their potential anti-inflammatory activity. *Journal of Natural Product*. 73:1234–1239.
- 44) **Gauthier, L. 1989.** Etude du pouvoir génotoxique des eaux de surface, potables ou en cours de traitement, par la formation de micronoyaux chez le triton *Pleurodeleswalti*; Thèse de doctorat, Toulouse 3.
- 45) **Goyal, R., Sharma, P. L. 2016.** Chemopreventive potential of certain non-nutrient components of diet. *Frontiers in pharmacology*, 7, 203.
- 46) **Gruenwald J, Brendler T et Jaenicke C. 2000.** PDDR for herbal medicines medicinal economics company montvale. New Jersey.
- 47) **Gurcharan S. 2004.** Plant systematics: an integrated approach. *Plant systematics: an integrated approach*
- 48) **Hsieh MS, Wang KT, Tseng SH, Lee CJ, Chen CH, Wang CC. 2011.** Using <sup>18</sup>F-FDG microPET imaging to measure the inhibitory effects of *Clematis chinensis* Osbeck on the pro-inflammatory and degradation mediators associated with inflammatory arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*. 3:511–517.
- 49) **Isman M B. 2000.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual review of entomology*. 51 : 45-66.
- 50) **Istifli ES, Ila HB.** Cytotoxicity – Definition, Identification, and cytotoxic compounds. IntechOpen. London, unitedkingdom. 2019, 105 p.
- 51) **Jangwan JS, Dobhal M. 2008.** New triterpene glycosides of *Clematis montana* and their cytotoxic activities. *Journal of Indian Chemical Society*. 85:313–316.
- 52) **Karp G. 1998.** Biologie cellulaire et moléculaire (concepts et expériences). De Boeck université. Bruxelles, P 665.
- 53) **Kirby A J, Schmidt R J. 1997.** The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs—I. *Journal of ethnopharmacology*. 56(2): 103-108.
- 54) **Konuk M, Liman R, Cigerci IH. 2007.** Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pak. J. Bot*. 39: 73.

- 55) **Kurás M, Nowakowska J, Sliwiska E, Pilarski R, Ilasz R, Tykarska T, Zobel A, Gulewicz K, 2006.** Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol* . 107: 211-221.
- 56) **Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M, Hseini H.2009.** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaïr (Maroc occidental). 457-4184.
- 57) **Larmarcovai Gwenaëlle, Alain Botta, Thierry Orsière .2007.** Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles Volume 94, numéro 4, Avril 2007.
- 58) **Lee TT, Alvin NS, John JJ.1982.** Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: Structure-activity relationships.3: 517-523.
- 59) **Lemière Sébastien. 2004.** Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale (Doctoral dissertation), Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz.
- 60) **Li J, Chen L, Chen Q, Miao Y, Peng Z, Huang B, Guo L, Liu D, Du H. 2021.** Allelopathic effect of *Artemisia argyi* on the germination and growth of various weeds. *Scientific Reports*. 11(1):1–15.
- 61) **Lorans .2009.** Rapport RECORD ; Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets [archive], 163 p., no 07-0667/1A.
- 62) **Lubini G, Fachinetto JM, Laughinghouse HD, Paranhos JT, Silva ACF, Tedesco SB. 2008.** Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia*.63: 647-651.
- 63) **Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économique). PPUR presses polytechniques.
- 64) **Maillet M.2002.** Biologie cellulaire. Masson. Paris. P 257 -274
- 65) **Maity S, Chatterjee S, Variyar P S, Sharma A, Adhikari S, Mazumder S. 2013.** Evaluation of antioxidant activity and characterization of phenolic constituents of *Phyllanthus amarus* root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .61(14) :3443-3450.
- 66) **Marcano L, Carruyo L, Fernandez Y, Montiel X, Torrealba Z.2006.** Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L) and its correlation with toxicity. *Biocell* .30:259-267.
- 67) **Miara MD, Bendif, Rebbas K, Rabah, B, Hammou MA, Maggi F. 2019.** Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*. 16: 100262.

- 68) **Mostafa M, Ahmed S, Afolayan A J. 2018.** Antioxidant activity of *Clematis brachiata* Thunb. leaf. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 53(3):185-190.
- 69) **Narwal SS, Sampietro DA, Catalán C A N. 2008.** Laboratory bioassays in allelopathy Plant bioassays .(pp. 3–20)..
- 70) **Natarajan AT.1993.** Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. Environ Health Perspect. 101(Suppl 3): 225- 229.
- 71) **Natarajan A et Obe G.1984.** Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. Chromosoma, 90:120-127.
- 72) **Newman DJ, Cragg GM. 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of natural products. 75(3): 311-335.
- Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Technique et documentation Lavoisier. Paris.
- 73) **Newman EI, Miller MH. 1977.** Allelopathy Among Some British Grassland Species: II. Influence of Root Exudates on Phosphorus Uptake . Journal of Ecology .pp : 399-411.
- 74) **Olorunfemi D.I. et Ehwre E.O. 2011.** Chromosomal aberrations induced in root tips of *Allium cepa* by squeezed Garri extracts. Report and Opinion. 3: 155-160.
- 75) **Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal, YK 2015.** Secondary metabolites of plants and their role (Overview. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy). 9(3): 293-304.
- 76) **Panda BB, Sahu UK. 1985.** Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion. Cytobios. 42 :167-168, pp. 147–155.
- 77) **Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. 2012.** An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. Asian Pacific Journal of Tropical biomedcin. P 320 -330.
- 78) **Patwardhan B, Mashelkar, R A.2009.** Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward. Drug discovery today. 14(15-16) :804-811.
- 79) **Paul A, Nag S, Sinha K. 2013.** Cytological Effects of Blitox on Root Mitosis of *Allium*. 3: 1–7.
- 80) **Peng H, Li H, Wang Y, Liu YH, Li CY, Meng L. 2009.** *Clematis montana* lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. Peptides. 30:1805–1815.
- 81) **Pieroni A, Nebel S, Quave C, Münz H, Heinrich M. 2002.** Ethnopharmacology of liakra: traditional weedy vegetables of the Arbëreshë of the Vulture area in southern Italy. Journal of ethnopharmacology. 81(2) : 165-185.

- 82) **PillcoAraceli , Eduardo de la Peña . 2014.** Genotoxicity Assays. In: Le María Sierra et Isabel Gaivão, 2014, Genotoxicity and DNA Repair A Practical Approach, Humana, New York.
- 83) **Preston RJ. 2014.** Chromosome aberrations . P,955-958.
- 84) **Quezel P, Santa, S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No. 581-965 Q8).
- 85) **Quezel P, Santa S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et de région désertique méridionales. Tome I. Paris: CNRS .p :363-364.
- 86) **Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. 2012.** Seed germination and vigor. Annual Review of Plant Biology. 63:507-533.
- 87) **Roy S, Kundu LM, Roy GC, Barman M ,Ray S. 2021.** Cytotoxic and micronuclei Inducing effects of petroleum ether fraction of leaf aqueous extract of *Clerodendrum viscosum* Vent. in *Allium cepa* root tip cells. Cytologia 86: 261–266
- 88) **Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. 2010.** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil Food Chemistry .121 (4) : 996-1002.
- 89) **Saber AH. 1954.** Practical Pharmacognosy: With a General Study of Plant Organs. MISR SAE.
- 90) **Saleh A, Madany M, González L. 2015.** The effect of coumarin application on early growth and some physiological parameters in faba bean (*Vicia faba* L.). Journal of Plant Growth Regulation. 34(2):233–241.
- 91) **Schofield P, Mbugua DM, Pell AN. 2001.** Analysis of condensed tannins: à review. Anim. Feed Sci. Technol. 91 : 21-40.
- 92) **Schulze E, Kirschner M. 1986.** Microtubule dynamics in interphase cells. Journal of cell biology. 102( 3) :1020-1031
- 93) **Silva CB, Cândido ACS, Simionatto E, Faccenda O, Scalon SPC, Peres MTLP. 2010.** Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenólicos totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). Acta Scientiarum Technology. 32 : 413–420.
- 94) **Souguir D, Ferjani E, Ledoigt G, Goupil P. 2008.** Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper induced genotoxicity. Protoplasma. 233: 203–207.
- 95) **Sudhakar R, Gowda N, Venu G. 2001.** Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. Cytologia. 66: 235–239.
- 96) **Tamura M. 1993.** New species and combinations in the Ranunculaceae. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 44(1): 27-28.
- 97) **Tanveer A, Jabbar MK, Kahliq A, Matloob A, Abbas RN, Javaid MM. 2012.** Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on

- germination and seedling growth of chickpea and wheat. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 72 :495-501.
- 98) **Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini VEP .2003.** Assessment of two medicinal plants *Psidiumguajava* L. and *Achilleamillefolium* L. in *in vitro* and *in vivo* assays .*Genetics and Molecular Biology*. 26: 551-555
- 99) **Telabotanica.** [https://www.telabotanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num\\_nom=18193&onglet=synthese](https://www.telabotanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num_nom=18193&onglet=synthese)
- 100) **Tilford GL. 1997.** Edible and Medicinal Plants of the West. Missoula, MT: Mountain Press Publishing. p : 190-191.
- 101) **Turkoglu S. 2007.** Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L, *Mutat Res*. 626(1-2): 4-14.
- 102) **Valerio ME., García JF, Peinado FM. 2007.** Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Total Environ*. 378 : 63–66.
- 103) **Ventura BC, Angelis DF, Marin-Morales MA. 2008.** Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay .*Pesticide Biochemistry and Physiology*. 90: 42-51.
- 104) **Zandi P, Barabasz-Krasny B, Stachurska-Swakoń A, Puła J, Mozdzeń K. 2018.** Allelopathic effects of *Stellaria media* (L.) Vill. on germination and early stages of growth of *Raphanussativus* var. *radicula*. *Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis Studia Naturae*. 3:90-99.
- 105) **Zhang LJ , Huang HT, Huang SY, Lin ZH, Shen CC, Tsai WJ, Kuo YH. 2015.** Antioxidant and anti-inflammatory phenolic glycosides from *Clematis tashiro*, *Journal of natural products* 78(7): 1586-1592.
- 106) **Zhizhi D, Na Zhu, Na ZRWM, Yuemao S. 2003.** Two new antifungal saponins from the Tibetan herbal medicine *Clematis tangutica*. *PlantaMedica*. 69: 547–551.

**Mémoire réalisé par:**

Bouhali Zoubeyda

Bouzered Chourouk

Brighet Asma

**Thème :Evaluation de l'effet cytotoxique et génotoxique de l'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa*****Résumé**

L'extrait de *Clematis cirrhosa* a été étudié afin d'analyser son teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes, son activité de piégeage des radicaux libres DPPH, son activité allélopathique, cytotoxique et génotoxique. La teneur totale en phénols (méthode de Folin-Ciocalteu) s'est révélée être 115 mg EAG/g. La teneur totale en flavonoïdes (méthode du Chlorure d'aluminium) a montré que la teneur totale en flavonoïdes est 0.245 mg EQ/g. La teneur en tanins 157,68 mg ECT/g. L'activité antioxydante a été déterminée en utilisant un test de piégeage des radicaux libres DPPH. L'extrait méthanolique de l'espèce a montré une activité antioxydante modérée. L'extrait aqueux de *Clematis cirrhosa* a montré un effet inhibiteur pour la germination et l'allongement des racines de l'*Allium cepa*. De plus, cet extrait a également inhibé l'élongation racinaire, réduit l'indice mitotique et augmenté l'indice d'aberration chromosomique chez l'*Allium cepa*. Des altérations chromosomiques telles que la C-mitose, la Stickness chromosomique, le pont chromosomique, le chromosome vagabond, le micronoyau ainsi que les noyaux allongés ont été observées dans les cellules de l'oignon exposées à cet extrait. Ces résultats suggèrent que les extraits aqueux et méthanolique de *Clematis cirrhosa* contiennent des composés aux propriétés allélopathiques et cytotoxique. Ces propriétés peuvent être utilisées comme l'industrie des biopesticides et dans la fabrication des produits pharmaceutiques contre les cellules cancéreuses.

**Mots clé :**

*Clematis cirrhosa*, *Allium cepa*, cytotoxique, génotoxique, allélopathique, indice mitotique, indice d'aberration chromosomique, activité antioxydante, extrait méthanolique, DPPH