



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri  
Constantine Faculté des Sciences de  
la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Animale. قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie et Santé

Intitulé :

---

**L'application du test micronoyau pour l'évaluation  
de l'effet antimutagène chez les souris.**

---

Présenté et soutenu par :-BELAGOUNE Asma Nour El Houda

Le : 04/09/2019

-REBAHI Samia

Jury d'évaluation :

Président du jury : Menad Ahmed (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : Dr Derouiche Mohamed Taha (Maitre Assistant en Pharmacie- Constantine 3).

Examineurs : Benrebai Mouad (Maitre de conférence A- UFM Constantine).

Kandouli Chouaib (Maitre de conférence B- UFM Constantine )

*Année universitaire 2018/2019*

## Remerciement :

- ❖ Nous tenons à remercier **Dieu** le tout puissant de nous avoir accordé la santé, donné le courage, la et la patience pour réaliser ce travail.
- ❖ Nous exprimons nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à *Dr Med. T.DEROUICHE* pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre compétence, votre sérieux et votre richesse d'enseignement. Veuillez trouver, cher maître, dans ce modeste travail, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.
- ❖ Nous tenons à remercier très sincèrement *Dr. LALAOUNA.A. J* pour l'honneur qu'il nous a fait en participant à notre travail.
- ❖ Aux membres du jury, Nous sommes très sensibles par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

**DEDICACE**

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tout ceux qui me sont chers,

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père **REZKI**.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore **RADYA**.

Aux personnes dont j'ai bien aimé, à tous mes très chers frères (**SAMI**, **WASSIM**, **OUSSAMA**, **AMOUNEEM** et **NASSIM**) et mes belles sœurs (**TASSNIM** et **WISSAM**), mes chères grandes mères (**REBH** et **HEDDA**) et à toute ma famille, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et frères de cœur, toi **HOUDA**, **SARA** et **HADJIRA**.

**A TOUT MES PROCHES ET MES BIEN AIMEES.**

Puisse Dieux vous donne santé, bonheur, courage, et surtout réussite.

**SAMIA REBAHI**



**Louange à Dieu tout puissant, qui m'a  
permis de voir ce jour tant attendu**

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

\*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père *Mohamed*

\*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse:  
mon adorable mère *Stidel* .

\*A vous mes frères (*Ramzi , Oymen , Nader , Achraf et Fadi*)  
et sœurs (*Mourhane, Rafif et Dania*) qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

\*A mon cher grand-père *Bachir* disparu trop tôt ,qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. *Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde .*

\*A mes grands-mères *Saliha et Houria*, mes oncles *Mohamed ,Kamel , Yazid , Mourad , Rida et Faycel* et mes tantes *Linda ,Sofia ,Radia ,Siham ,Layla et Soumia*. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

\*A tous les cousins surtout *Chourouk , Imen , Rayane ,et Yacine* ,et les voisins surtout *Gamra* . Merci pour leurs amours et leurs encouragements.

\*A mes chères amies *Alfal ,Kadjira et Sara* Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

\*Sans oublier mon binôme et mon amie intime *Samia(Sara)* pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

*A toute ma famille,*

*A tous mes autres ami(e)s,*

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.*

*HOUDA*

## Sommaire

Introduction.....	01
-------------------	----

### **Première Partie : Données bibliographiques**

#### **Chapitre I : la génotoxicité**

I -1- Lésion et mutations de l'ADN.....	04
I -1-1 Lésion d'ADN.....	04
I -1- 1-1 lésions sur les nucléobases .....	04
I -1-1-2- lésions du squelette sucre-phosphate.....	05
I - 1-1-3- pontages interbrins .....	05
I -1-2- mutations de l'ADN.....	05
I -1.2.1- Mutations géniques .....	06
I -1-2-2- Les Mutations chromosomiques .....	07
I -1-2-2-1 LES ANOMALIES DE STRUCTURE .....	07
I -1- 2-2-2- LES ANOMALIES DE NOMBRE .....	08
I -2- Les agents mutagènes.....	09
I -2-1 Agents physiques .....	09
I -2-1-1 les radiations ionisantes.....	09
I -2-1-2 les radiations UV .....	09
I -2-2- Les agents chimiques .....	10
I -2-2-1-Les agents chimiques endogènes .....	10
I -2-2-2-les agents chimiques exogènes.....	11
I -3- Les conséquences de mutations.....	12
I -4 –Cancérogénèse.....	13
I -4-1-Etape d'initiation.....	13
I -4-1-1- Caractéristiques d'une cellule cancéreuse.....	14
I -4-2-Étapes de progression et d'invasion tumorale .....	14
<b>Chapitre II : l'évaluation de la génotoxicité : principe et protocole du test micronoyau</b>	
II -1- Les tests de mutation génique.....	15

II -2- Les tests d'altération primaire et de réparation de l'ADN.....	15
II -3- Les tests de mutation chromosomique.....	16
II -4-Test micronoyau.....	16
II -4-1- Historique du test .....	16
II -4-2 -Définition et objectif.....	17
II -4-3- Principe et protocole de test des Micronoyau.....	17
II -5-1-Description de la méthode d'essai.....	18
II -5-2- Mode opératoire.....	19
II -5-3- Résultats.....	21

### **Chapitre III : substance antimutagénique : définition et mécanisme**

III-1-Définition .....	22
III-2-Les types d'antimutagènes.....	22
III-2-1-Les Desmutagènes.....	22
III-2-2- les Bioantimutagènes.....	23
III-3-Les mécanismes d'action d'antimutagènes.....	23
III-3-1-Les mécanismes d'action des Desmutagènes.....	23
III-3-2-Les mécanismes d'action de bioantimutagènes.....	23

### **Chapitre IV:l'intérêt du test micronoyau dans l'évaluation de l'activité antimutagénique**

IV-1-définition et classification des biomarqueurs.....	24
IV-1-1-Les biomarqueurs d'exposition.....	24
IV-1-2-Les biomarqueurs d'effet.....	25
IV-2-La définition et l'origine du MN .....	25
IV- 3- l'intérêt de test MN .....	26

### **Chapitre V : aspects botanique et phytochimique de Tilia cordata**

V-1-Etymologie .....	29
V-2-Données botaniques générales de famille des tiliacées.....	30
V-3-Caractéristiques botanique de l'espèce tilia cordata .....	30
V-3-1-Classification botanique.....	30
V-3-2-Répartition géographique .....	31



V-3-3- Les composition botanique.....	31
V-4-Composition phytochimique et leur effet.....	33
V-4-1-Les fleur .....	33
V-4-2-Les bractées .....	36
V-4-2-L' aubier .....	36
V-5-Usages médicinaux .....	37

### **Chapitre VI:Potentiel antimutagenique de *tilia cordata***

VI-1-Les Composés phénoliques.....	40
VI-1-1-les flavonoïdes.....	42
VI-1-1-1-Quercétine.....	43
VI-1-1-2-Kaempferol.....	44
VI-1-2-Les acides phénoliques .....	45
VI-1-2-1 L'acide caféique.....	45
VI-1-2-2- L'acide p-coumarique.....	46

### **Deuxième partie : Partie pratique**

<b>I -Matériel et Méthodes</b> .....	48
I -1- Matériel .....	48
I -1-1- Réactifs .....	48
I -1-2-Substances d'essai .....	48
I -1-3-Instruments .....	49
I -1-4-Animaux .....	49
I -2-Méthodes.....	50
I -2 -1 -préparation d'extrait aqueux .....	50
I -2- 2-Préparation des solutions à administrer.....	50
I -2-3-Sélection et préparation des animaux.....	51
I -2-4-Application du test de MN dans l'évaluation de l'effet antimutagène.....	51
I -2-5-Mode opératoire.....	52
a-Traitement.....	52
b.Prélèvement.....	52
C-préparation des frottis.....	54
d-coloration.....	55
e-Lecture sous microscope optique.....	59
<b>II -Résultats</b> .....	60
II -1-Etude antimutagénique .....	60
II -2-Analyse statistique.....	62

II -2-1 -L'Analyse statistique de rapport MNPCE/2000PCE.....	63
II -2-2-L'Analyse statistique de rapport PCE/2000NCE.....	64
<b>III-Discussion</b> .....	65
<b>IV- Conclusion et perspectives</b> .....	71
<b>V-Bibliographie</b> .....	72

## Liste des abréviations :

**4-NQO** : 4-nitroquinoline-N-oxid

**6-4 PP** :pyrimidines (6-4) pyrimidone

**8-oxoG** : 8-oxo-7,8-dihydroguanine

**AC** : aberrations chromosomiques

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AFB1** : aflatoxine B1

**ARN** : Acide ribonucléique

**BrdU** : bromodéoxyuridine

**CaA** : cafeique acid

**ChA** : chlorogénique acid

**COX** : cyclooxygénase .

**CPA** : cyclophosphamide

**CPD** : cyclobutane pyrimidine dimer

**DM** : Double minute chromosome

**DMT** : dose maximale tolérée

**DXR** : doxorubicin

**EA** : Extrait aqueux

**ÉCS** : échanges entre chromatides sœurs

**EMA** : European Medicines Agency

**ERO** : espèces réactives de l'oxygène

**ETC** : chaîne de transport d'électrons

**FDA** : Food and Drug Administration .

**Glu-P-2** : 2-aminodipyrido [1,2-a : 3',2'-d]imidazole

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polynucléaires

**HER2**: human epidermal growth factor

**HUMN** : Human Micronucleus .

**IC 50** : Inhibitory median concentration

**IWGT** : international workshops on genotoxicity testing

**LOX** : lipooxygénase .

**MG** : May Grunwald

**MGG** : May Grunwald Giemsa

**MLH1** : MutL Homolog 1

**MN** :micronoyau

**MNNCE** : erythrocyte normochromatique micronuclée

**MNPCE** : erythrocyte polychromatique micronuclée

**MO** :moelle osseuse

**MSH2**: MutS Homolog 2

**Myc** : Myelocytomatosis virus

**Nar** : naringin

**NCE** : normochrome erythrocyte

**NF** :Normal Fibroblasts

**OCDE** : Organisation de coopération et de développement économiques

**p53**: protein 53

**PCE** : polychromatic erythrocyte

**QC** :quercétine

**Ras** : Rat sarcoma virus.

**RMN** : reduction des micronoyayu

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SAR** : structure-activity relationship

**SCGE** : Single Cell Gel Electrophoresis

**SMART** : Somatique Mutation and Recombinaison Test

**SOD** : superoxyde dismutase .

**SP** :sang pérephérique

**SOS** : Save Our Souls

**Trp-P-1** : 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido ]4,3-b[indole]

**WT1**: Wilm's Tumor 1

*fqce* : Fréquence

## Liste des figures :

<b>Figure 01</b> : l'effet des agents chimique sur la molécule d'ADN <sup>2</sup>	03
<b>Figure 02</b> : différents types de mutation génique <sup>2</sup>	07
<b>Figure 3</b> : Insertion chromosomique <sup>2</sup>	07
<b>Figure 4</b> : Délétion chromosomique <sup>2</sup>	08
<b>Figure 5</b> : Inversion chromosomique <sup>2</sup>	08
<b>Figure 6</b> : Generation des espèces reactive d'oxygène (ROS) par la mitochondrie <sup>10</sup>	10
<b>Figure 7</b> : Caractéristiques acquises des cellules cancéreuses <sup>18</sup>	14
<b>figure 8</b> :Concepts de des mutagènes et bioantimutagènes <sup>40</sup>	24
<b>Figure 9</b> : Le tilleul à petites feuilles <sup>5,6,7</sup>	30
<b>Figure 10</b> :Feuille de tilia cordata <sup>61,62</sup>	32
<b>Figure 11</b> :Fleur de tilia cortata <sup>56</sup>	32
<b>Figure 12</b> :les fruit de tilleul <sup>64</sup>	33
<b>Figure 13</b> : Differentes classes des composes phenoliques <sup>74</sup>	41
<b>Figure 14</b> : Structure chimique de base des flavonoïdes <sup>79</sup>	42
<b>Figure15</b> :l' Extrait aqueux de tilleul	50
<b>Figure 16</b> :démonstration des PCE (bleu) et des NCE (rose) sous microscope optique, objectif x100	60
<b>Figure 17</b> :démonstration de l'MNPCE sous microscope optique, objectif x100	60

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : principaux agents modifiant l'ADN et le type de lésions générées <sup>4</sup>	04
<b>Tableau 2</b> fournit une description de composition botanique de <i>Tilia cordata</i>	31
<b>Tableau 3</b> :les composants phytochimiques de fleur de tilleul et leur effet	33
<b>Tableau 4</b> : les composants phytochimiques de l'aubier de tilleul et leur effet	36
<b>Tableau 5</b> : présenter l'usage médicale de tilleul	37
<b>Tableau 6.</b> Actions protectrices et antigénotoxiques du CQ dans différents modèles in vivo et in vitro	44
<b>Tableau 7.</b> Quelques effet anticancerogenes de l'acide cafeique <sup>74</sup>	46
<b>Tableau8</b> :récapitulatif de Matériels	48
<b>Tableau 9</b> : récapitulatif de traitement appliqué	52
<b>Tableau 10</b> : récapitulatif de prélèvement appliqué	53
<b>Tableau 11</b> : préparation des frottis	54
<b>Tableau 12</b> : Préparation des solutions tampon de Sorensen	56
<b>Tableau 13</b> : Protocol de coloration	58
<b>Tableau 14:</b> Résultats du lot Témoin négatif	61
<b>Tableau 15:</b> Résultats du lot Témoin positif	61
<b>Tableau 16:</b> Résultats du lot traité par l'EA de tilleul	62
<b>Tableau 17</b> : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot Témoin positif	63
<b>Tableau 18</b> : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot test	63
<b>Tableau 19</b> : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin positif et du lot test	63
<b>Tableau 20</b> : Comparaison du résultat du lot Témoin négatif et du lot Témoin positif	64
<b>Tableau 21</b> : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot Test	64
<b>Tableau 22</b> : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin positif et du lot test	65

# INTRODUCTION



Le cancer arrive en deuxième cause de décès, derrière les maladies cardiovasculaires. En 2016, plus d'un décès sur quatre était dû à un cancer. Entre 1980 et 2016, le nombre a connu une croissance de plus de 25 pour cent<sup>110</sup>.

Ce type de maladies a une forte relation avec la mutation, qu'il paraisse communément admis que la mutation constitue un point-clé du démarrage du long processus de cancérogenèse<sup>111</sup>.

Dans le cas de cancer, la prévention, un diagnostic précoce et l'accès d'un traitement moderne jouent un rôle essentiel<sup>112</sup>.

Le traitement complet contre le cancer reste insaisissable malgré les progrès de la recherche médicale et de la technologie. Les traitements anticancéreux actuels sont la chirurgie radicale, la chimiothérapie et la radiothérapie susceptibles de provoquer chez les patients une détresse physique et psychologique indésirable. Il est nécessaire pour les efforts mondiaux continus à la recherche de nouvelles composées anticancéreuses qui possèdent une efficacité thérapeutique élevée et moins d'effets secondaires que les médicaments anticancéreux existants sur le marché<sup>100</sup>.

Les études toxicologiques ont fait l'objet d'une évaluation importante au cours de la dernière décennie, l'accent étant mis sur la toxicité chronique, la cancérogénicité, la tératogénicité et la mutagénicité. Bien souvent, les risques de mutation sont dus non seulement à la présence d'agents génotoxiques, mais également à l'absence d'agents antimutagènes / anticancérigènes dans notre alimentation. Comme nous ne pouvons éviter beaucoup de ces substances, le meilleur moyen de minimiser cet effet consiste à identifier les anti-mutagènes et les desmutagènes dans notre alimentation et à augmenter leur utilisation<sup>103</sup>.

La détection des substances naturelles antimutagènes et/ou anticarcinogènes ouvrirait de nouveaux horizons dans la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses. Dans ce contexte, les tests de la génotoxicité qui ont été conçus principalement pour la détection des substances mutagènes, peuvent être utilisés dans l'évaluation de l'activité antimutagène des produits aussi bien naturels que synthétiques. Ainsi, à l'aide de ces tests, plusieurs plantes et/ou certains de leurs constituants se sont identifiés antimutagènes et/ou anticarcinogènes<sup>112</sup>.

Ces tests de mutagénicité revêtent une importance primordiale, car les produits chimiques existant dans l'environnement humain peuvent provoquer des modifications héréditaires néfastes sans montrer d'effets toxiques immédiats<sup>103</sup>.

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes, qui forment des sources riches en produits naturels utilisés depuis des siècles pour soigner diverses

maladies. Il est estimé qu'environ 60% à 75% de la population mondiale et 80% de la population Africaine recourt à la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins pour lesquelles la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs de ces dernières, c'est parce que elles produisent une large gamme de composés phytochimiques qui sont utilisés par la plante comme un produit chimique de défense contre les prédateurs. Plusieurs études dans le passé ont indiqué que les produits naturels pouvaient être utilisés comme agents chimiopréventifs contre les dommages mutagènes. Ces composés présentent des effets préventifs contre la mutagenèse par plusieurs voies, dont l'une est importante en désactivant les radicaux libres<sup>113</sup>.

Le test *in vivo* du micronoyau dans le sang périphérique chez les rongeurs est l'une des méthodes établies pour évaluer les mutagènes et les antimutagènes chez les mammifères. Le test, s'il est effectué correctement, peut identifier les mutagènes et également déterminer le potentiel antimutagène<sup>103</sup>.

De ce fait, l'objectif de notre travail est l'application d'une méthode permettant l'évaluation de l'effet antimutagénique, ainsi que l'étude de cet effet d'une plante. Le test choisi pour l'évaluation de l'effet antimutagénique d'une plante, ainsi que l'étude de cet effet est le test des micronoyaux *in vivo*.

Ce test qui est en principe un test toxicologique -révélant l'activité mutagénique des substances- possède une application pharmacologique reposant sur le dénombrement de micronoyaux résultant d'un phénomène mutagénique, en l'utilisant pour étudier la capacité de certains composés à diminuer l'effet mutagénique d'une substance connue responsable de cette lésion.

Nous avons choisi une plante intensivement utilisée en médecine traditionnelle qui est le tileul, Malgré leur utilisation intensive, le nombre d'étude scientifique d'évaluation de l'utilisation thérapeutique est limité. Il devient donc essentiel d'étudier leur effet et vérifier est ce que réellement le tileul possède un effet antimutagène ?

**PREMIER PARTIE :**

**DONNÉES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## Chapitre I : la génotoxicité :

L'ADN, support porteur de l'information génétique, est sujet à des altérations de bases ou de nucléotides consécutives, d'une part à des erreurs spontanées, d'autre part à des lésions de l'ADN induites par des agents physiques ou chimiques qualifiés de génotoxiques. Certaines de ces lésions seront converties en mutations et la survenue de mutations au niveau des cellules somatiques peut induire l'initiation d'un processus carcinogénique. Au niveau germinale, les mutations peuvent induire des infertilités ou se transmettre à la descendance 1.

La toxicologie génétique ou génotoxicité est l'étude de la toxicité de substances sur l'acide désoxyribonucléique (ADN)1, causant des lésions ou mutations, qui peut se manifester d'une part directement par action sur le matériel génétique (adduits, cassures de brins) des catabolites électrophiles formés par bioactivation du pro-cancérogène initial, processus sous la dépendance de facteurs génétiques (polymorphismes) et/ou acquis (interactions enzymatiques en phase I des biotransformations métaboliques) ou par l'intermédiaire de la production d'espèces radicalaires telles que les espèces réactives de l'oxygène (ERO), entités électrophiles génératrices de lésions oxydatives de l'ADN (adduits, cassures simple brin), et d'autre part indirectement par l'intermédiaire des lésions des macromolécules biologiques par ces mêmes composés générant des altérations de l'appareil mitotique, des adduits secondaires exocycliques sur l'ADN et des dysfonctionnements enzymatiques. Les systèmes de réparation de la cellule sont responsables d'éliminer ces lésions<sup>3</sup>. Néanmoins, une réparation imparfaite peut aussi conduire à des mutations géniques qui risquent d'engendrer des cancers<sup>2</sup>. (figure1)

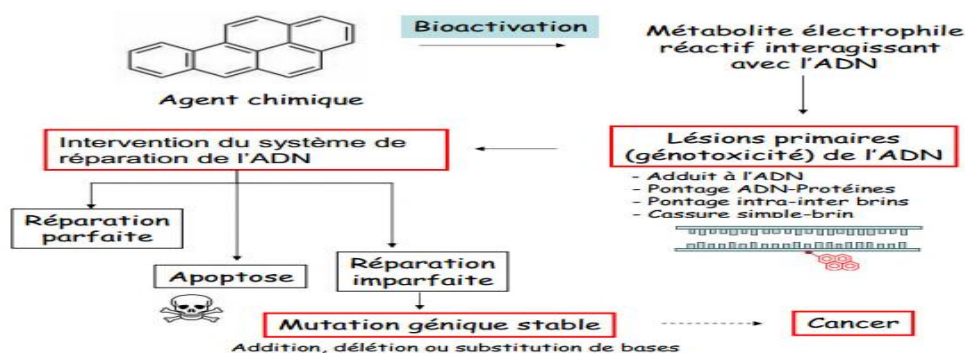


Figure 01 : l'effet des agents chimique sur la molécule d'ADN<sup>2</sup>

## I -1- Lésion et mutations de l'ADN :

### I-1-1 Lésion d'ADN :

L'ADN est une macromolécule biologique dans laquelle la séquence en nucléotides, la configuration et la situation des nucléotides au sein de la double hélice et l'état de la molécule d'ADN (en cours de réplication ou de transcription, sous forme de chromatine ou de chromosome) jouent un rôle considérable dans la survenue des lésions puis des mutations<sup>2</sup>.

Toute modification de la structure moléculaire du matériel génétique est considérée comme une lésion de l'ADN. Des variations dans l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques et dans la mise en œuvre des systèmes de réparation de l'ADN peuvent expliquer des différences d'intensité de ces lésions<sup>2</sup>.

Le tableau 1 recense les principaux agents qui modifient l'ADN et le type de lésions qu'ils génèrent.

Tableau 1: principaux agents modifiant l'ADN et le type de lésions générées<sup>4</sup>.

Agents modifiant l'ADN	Lésions générées
Réactions spontanées	Sites abasiques
Espèces radicalaires de l'oxygène	Bases oxydées, désaminées et alkylées
Agents alkylants	O6-méthylguanine
Rayons X	Cassures simple brin
Rayons ultraviolets	Dimères de pyrimidine
Rayons X, agents anticancéreux	Cassures double brin
Mutagènes environnementaux (HAP)	Gros adduits
Erreurs de réplication	Mésappariements, délétions, insertions

Il est possible de classer ces lésions suivant leur localisation sur génome :

### I-1- 1-1 lésions sur les nucléobases :

#### a- mésappariements :

La principale source d'altérations de l'ADN au cours de son métabolisme est le mésappariement de bases. ce phénomène se produit au cours du processus de synthèse de l'ADN et concerne donc, essentiellement la synthèse répllicative semi-conservative de l'ADN et dans une moindre mesure la réparation et la recombinaison de l'ADN.

### **b- réactions d'hydrolyse :**

La liaison glycosidique des purines est particulièrement sensible à l'hydrolyse acide. cette dépurination mené à la formation d'un site abasique . avec la perte de l'information génétique, la dépurination peut conduire à une mutation durant la réplication de l'ADN.

Il a été estimé que presque 104 sites abasiques sont formés chaque jour dans une cellule humaine.

### **c-réactions d'oxydation :**

Le métabolisme cellulaire endogène est la source de nombreuses espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) telles que les ions superoxyde, les radicaux hydroxyles et l'oxyde nitrique. Ces sous produits de l'oxygène réagissent avec l'ADN pour former plus de 100 lésion différentes. la lésion la plus fréquente est la 8-oxo guanine qui est mutagène et bloquer la transcription.

### **d- réactions de méthylation :**

Certains cofacteurs enzymatiques, généralement des sources de groupements méthyl, peuvent accidentellement méthyler l'ADN.

#### **I -1-1-2- lésions du squelette sucre-phosphate :**

Les lésions du squelette sucre-phosphate sont générées principalement par oxydation du sucre désoxyribose. à terme , ces lésions évoluent en cassure simple brin et dans certains cas peuvent induire de nombreux sites sévèrement endommagés et très proches qui aboutissent à la formation de cassures double brin.

#### **I - 1-1-3- pontages interbrins :**

Une liaison covalente apparait entre deux bases sur les brins opposés. cette liaison covalente est créée par une molécule électrophile bifonctionnelle, le plus souvent , ce sont des molécule comme le psoralène ou certains médicament anticancéreux (mitomycine ou cisplatine) <sup>4</sup>.

Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade consécutivement à l'action d'un agent génotoxique. L'ADN est chimiquement ou physiquement modifié. Ces modifications de la structure de l'ADN font l'objet d'une réparation parfaite ou fautive. En cas de réparation fautive, il apparaît alors des mutations <sup>2</sup>.

#### **I -1-2- mutations de l'ADN :**

Le terme mutation se réfère à toutes modifications stables du patrimoine génétique transmissibles de division cellulaire en division cellulaire. A ce niveau, on distingue les

mutations concernant une à quelques paires de bases, qualifiées de mutations géniques, et les mutations chromosomiques de structure concernant le plus souvent des dizaines de kilobases. La dernière classe de mutations concerne les modifications chromosomiques de nombre (ou mutations génomiques) le plus souvent consécutives à des interactions moléculaires au niveau des protéines et non de l'ADN<sup>2</sup>. Les mutations dans les cellules germinales peuvent engendrer des maladies génétiques et les mutations dans les cellules somatiques peuvent être à l'origine de cancers<sup>4</sup>.

On distingue différents types de mutations:

### **I -1.2.1- Mutations géniques :**

La mutation génique correspond à une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN de manière à soit arrêter complètement la synthèse d'une protéine, ou la modifier produisant ainsi une protéine inactive<sup>2</sup>.

**a- les mutations par substitution :** qui conduisent au remplacement d'une purine par une autre purine, ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine (transition) (ex : G→A) ou au remplacement d'une purine par une pyrimidine, et inversement (transversion) (ex : A→T).

**b- les mutations par délétion de bases :** avec perte d'une ou plusieurs bases.

**c- les mutations par insertion de bases :** avec ajout d'une ou plusieurs bases.

**d- Conséquences de ces mutations :** on distingue :

**-les mutations sans changement du cadre de lecture :** résultent de mutations par substitution. la mutation peut être :

\*silencieuse : lorsque la composition en acides aminés de la protéine ne change pas en raison de la dégénérescence (redondance) du code génétique.

\*faux sens : le remplacement d'un acide aminé par un autre (le codon CTC est remplacé par CAC, le glutamate est remplacé par une valine au niveau de la protéine).

\*non-sens : une substitution de bases transforme le codon d'un acide aminé par un codon de terminaison et la protéine est écourtée dans sa séquence .

**-les mutations avec changement du cadre de lecture (ou Frame shift mutations) :** résultent de l'addition ou de la délétion d'un ou plusieurs (pas en multiple de trois) nucléotides dans la région codante d'un gène . ceci modifie le cadre de lecture car les codons sont des groupes de trois nucléotides<sup>4</sup>. ce type de mutations illustrées dans la figure 2 .

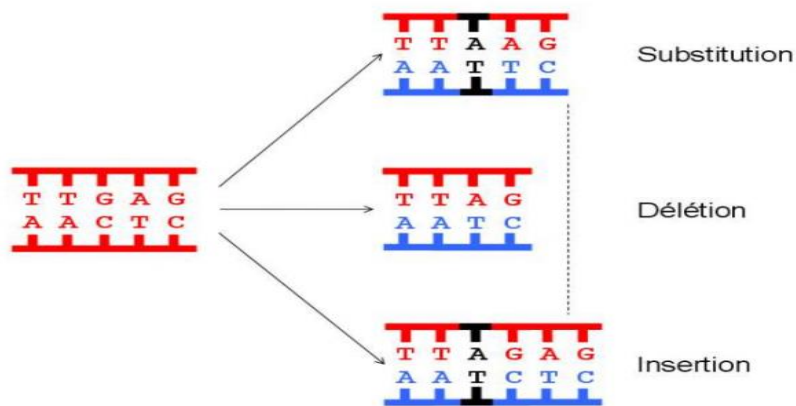


Figure 02 : différents types de mutation génique<sup>2</sup>

**I -1-2-2- Les Mutations chromosomiques :**

Consistent-en des modifications du structure (clastogènes) ou de nombre (aneugènes) des chromosomes :

**I -1-2-2-1 LES ANOMALIES DE STRUCTURE :**

Selon la définition classique, les anomalies de structure sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs recollements anormaux<sup>5</sup>. Ces mutations sont plus détaillées ci-dessous :

**A- Insertion :**

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



Figure 3: Insertion chromosomique<sup>2</sup>.

**B-Délétion :**



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

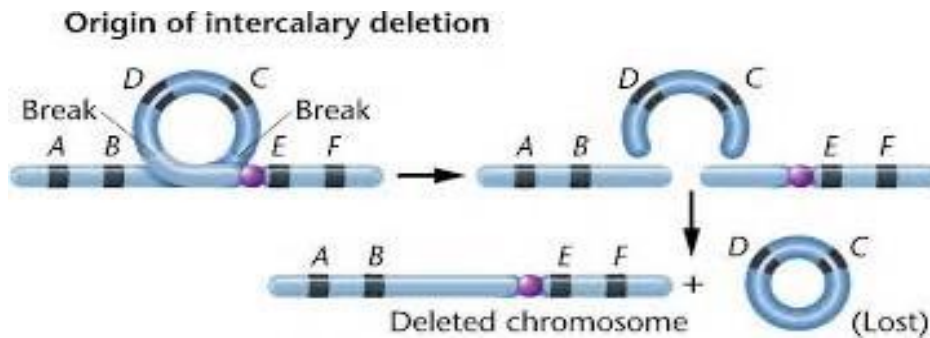


Figure 4: Délétion chromosomique <sup>2</sup> .

### C-Inversions :

Résultent de deux cassures sur un même chromosome suivi de recollement après inversion du segment intermédiaire (Figure 5) .

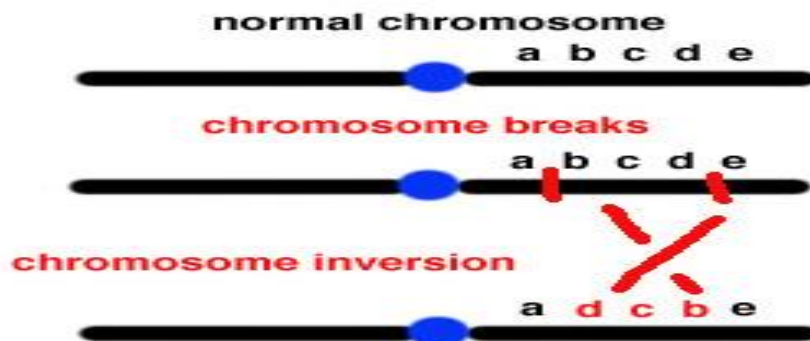


Figure 5: Inversion chromosomique <sup>2</sup> .

### D-Translocations réciproques (t) :

Ces translocations sont dues à des échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes.

### E-Translocations robertsoniennes (rob) :

Elles se produisent entre chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) par fusion centrique ou, le plus souvent, par cassures dans les régions juxtacentromériques .

### I -1- 2-2-2- LES ANOMALIES DE NOMBRE :

a- **les aneuploidies** : c'est à dire la perte ou le gain d'un ou quelques chromosomes.

**b- Les polyploïdies :** désignent un nombre anormal de lots haploïdes entiers. Normalement chaque individu est constitué d'un lot haploïde maternel (n) et d'un lot haploïde paternel (n) soit 2n. Chez l'homme ont été décrit des :

-triploïdie (3n) : 69 chromosomes.

-tétraploïdie (4n) : 92 chromosomes<sup>5</sup>

Les mutations spontanées lors de la réplication sont très peu nombreuses grâce à l'activité correctrice des ADN polymérase. Un agent mutagène augmente le taux de mutation au sein d'un génome <sup>6</sup>.

### **I -2- Les agents mutagènes :**

Plusieurs types d'éléments sont impliqués dans la survenue de « mutations ».

#### **I -2-1 Agents physiques :**

##### **I -2-1-1 les radiations ionisantes :**

les radiations ionisantes (rayons X, rayons gamma et les ions lourds).ces lésion sont la conséquence d'une chaîne de réactions biochimiques, entraînées par l'absorption des photons dans les compartiments subcellulaires (diffusion d'énergie), provoque la rupture d'un certain nombre de liaisons chimiques. L'ADN est donc agressé soit directement, soit indirectement (par radiolyse de l'eau et la formation de radicaux oxygénés: les cellules contiennent 80% d'eau) par les radiations ionisantes<sup>4</sup>.

##### **I -2-1-2 les radiations UV (100-400 nm) :**

Les UV constituent, d'un point de vue énergétique, la partie la plus active du rayonnement solaire auquel sont soumis les organismes vivants. Ils sont donc responsables de la grande majorité des effets délétères liés à l'exposition solaire<sup>7</sup>.

Le spectre UV est divisé en UVC (100-280nm), UVB (280-320) et UVA (320-400).ces rayons peuvent agir soit directement (UVC et UVB), soit indirectement (UVA)<sup>4</sup>.

-**Les Lésions induites par les UVC et les UVB sur l'ADN** : les dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD) et les 6-4 PP « L'énergie absorbée au niveau de deux pyrimidines ( C ou T) adjacentes fournit l'énergie nécessaire à la formation d'une liaison covalente entre ces deux bases, au détriment des liaisons hydrogène établies entre deux bases complémentaires et assurant la cohésion de la double hélice d'ADN ».

- **Les Lésions induites par les UVA** :oxydation de la guanine « (8-oxoG) principalement<sup>7</sup>.Les UVA sont génotoxiques en générant des radicaux libres par l'intermédiaire de photo sensibilisateurs<sup>4</sup>.

### I -2-2- Les agents chimiques :

Les agents chimiques sont de petites molécules qui vont cibler les voies de signalisation conduisant à la prolifération ou à la mort de la cellule, le faisceau mitotique, la réplication, la transcription ou aussi la réparation de l'ADN <sup>8</sup> .

#### I -2-2-1-Les agents chimiques endogènes :

Le métabolisme cellulaire normal produit entre autre des espèces réactives de l'oxygène (à partir des mitochondries), sources de nombreux dommages<sup>4,9</sup>.  $O_2 \cdot$  est formé à partir d' $O_2$  moléculaire par le gain d'un seul électron dû à une fuite d'électron dans la chaîne de transport d'électrons (ETC) des mitochondries. Les enzymes SOD convertissent deux molécules de superoxyde en  $H_2O_2$  et une molécule  $H_2O$ . De plus, le peroxyde d'hydrogène est converti en ROS hautement réactif, l'hydroxyle ( $OH \cdot$ ), en présence de fer ( $Fe^{2+}$ ), ce qui provoque en outre des dommages à la structure cellulaire, notamment des protéines, des lipides, des membranes et de l'ADN (figure 6)<sup>10</sup> .

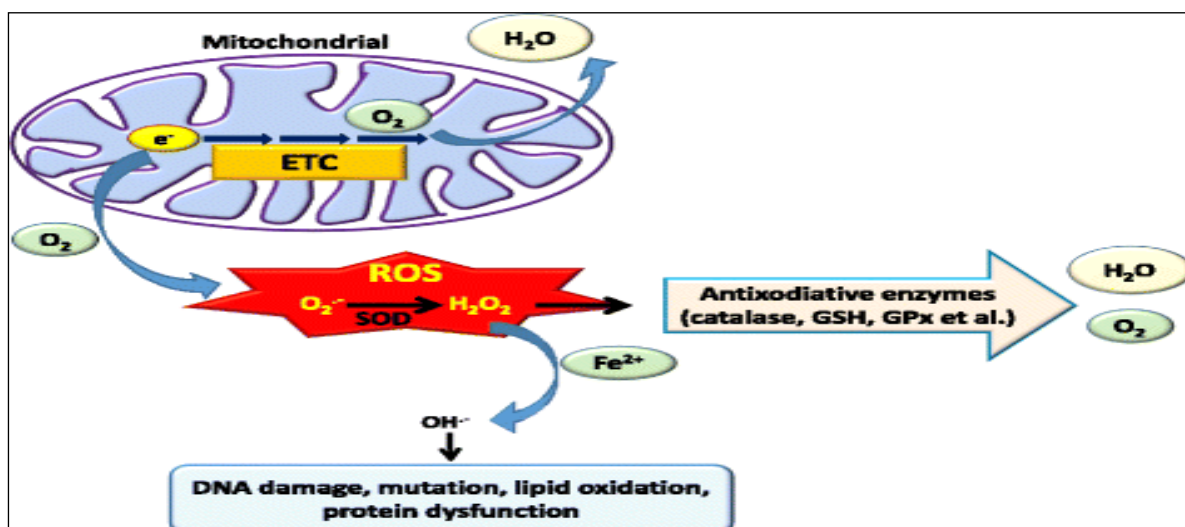


Figure 6 : Génération des espèces réactives d'oxygène (ROS) à partir des mitochondries <sup>10</sup> .

Ces radicaux sont par définition des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides<sup>11</sup>.

### **I -2-2-2-les agents chimiques exogènes :**

#### **a-agents alkylants :**

Les agents alkylants représentent la plus ancienne classe d'agents anticancéreux. Même si leur utilisation actuelle est sans comparaison avec celle des nouvelles thérapies ciblées, certains alkylants restent encore des molécules de premier plan dans certaines indications. Ces molécules sont des composés fortement électrophiles qui vont réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, -COOH ou -NH<sub>2</sub> que l'on retrouve dans les acides nucléiques et les protéines. L'interaction par liaison covalente entre l'agent alkylant et l'ADN produit différents types d'adduits. en fonction de l'isomérisation et du métabolisme de l'alkylant, la fixation se fait de manière partielle ou quasi-complète, monovalents (sur un nucléotide) ou bivalents (l'alkylant relie deux nucléotides adjacents pour former des ponts inter- ou intra-brins) au niveau de sites plus ou moins préférentiels au sein de l'ADN qui modifieront la structure de la double hélice (stabilisation/déstabilisation).

La fixation de ces molécules à l'ADN et notamment la formation de crosslinks inter brins empêche la réplication et la transcription<sup>12</sup>. De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brins de l'ADN ce qui conduit à l'apoptose de la cellule ou à la mise en exécution des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales (phénomène de résistance). Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines n'en présentent que deux (N7 et N3). L'azote N7 de la guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN, puis les suivants ont des potentiels de moins en moins élevés : O6- guanine et N3-adénine > N2-guanine, N3 guanine et N7-adénine .

#### **b) Les agents intercalant :**

Ce sont des molécules caractérisées par plusieurs noyaux aromatiques condensés, de dimension et structure telles qu'elles provoquent une détorsion de la molécule d'ADN et donc

un empêchement de la progression des ARN et ADN polymérase ainsi qu'une inhibition de la réplication et de la transcription<sup>10</sup> .

### **c) Les analogues des bases :**

leur structure chimique rappelle les purines et les pyrimidines. ils peuvent être incorporés à l'ADN lors de la réplication. Exemple : l'Aminopurine analogue de A s'apparie avec T et cause des transitions de A-T en G-C ou l'inverse<sup>13</sup> .

### **d) Les agents métabolisés en réactifs électrophiles :**

il apparaît qu'un grand nombre d'agents chimiques non polaires , c'est-à-dire chimiquement peu , voire pas réactif , induisent les dommages à l'ADN consécutivement à une activation métabolique qui leur confère des sites électrophiles réactifs vis-à-vis des sites nucléophiles des macromolécules biologiques , dont l'ADN<sup>4</sup>.

## **I -3- Les conséquences de mutations :**

Lorsque des mutations ponctuelles non réparées surviennent dans les lignées germinales, elles sont alors transmises à la descendance et sont à l'origine des maladies génétiques, parfois graves. La dérégulation des mécanismes de réparation et de signalisation est la source de l'instabilité génétique observée dans les cancers, et participe ainsi à la carcinogénèse. Pourtant, toutes les mutations ne sont pas délétères : certaines n'ont pas d'effet, et d'autres sont la source de la variabilité génétique entre individus. Certaines de ces mutations peuvent même être plus favorables à la survie de l'individu dans son environnement donné, ce qui favorisera alors la transmission de la mutation favorable à sa descendance par la sélection naturelle. Il y a ainsi une concurrence permanente entre le risque encouru par l'individu et le gain potentiel pour l'espèce. Les dommages à l'ADN réparés avec des erreurs sont donc un moteur essentiel à l'évolution des espèces<sup>9</sup>.

La relation entre génotoxicité (effet d'agents qui interagissent avec l'ADN et/ou la machinerie cellulaire qui maintient l'intégrité du génome), mutagenèse et cancérogenèse est admise mais sa démonstration demeure malaisée en raison de l'intrication de mécanismes stochastiques et déterministes, de facteurs héréditaires et de phénomènes acquis donc La compréhension des relations entre la Génotoxicité, la mutagenèse et la cancérogenèse demeure un thème de recherche complexe et sujet à de nombreuses évolutions bien qu'il paraisse communément admis que la mutation constitue un point clé du démarrage du long processus de cancérogenèse<sup>14,1</sup>.

### **I -4 -Cancérogénèse :**

La cancérogénèse est la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse résulte de l'accumulation d'altérations génétiques modifiant l'activité de gènes bien spécifiques<sup>1</sup>, et est un processus multiétapes qui est initié au niveau d'une cellule normale. Lors de l'étape d'initiation, la cellule normale va accumuler des altérations génétiques qui vont aboutir à l'acquisition par la cellule de caractéristiques anormales. Suite à une sélection clonale et une multiplication, les cellules vont progresser vers un stade tumoral cancéreux puis vers un stade métastatique<sup>15</sup>. La carcinogénèse est un processus généralement subdivisé en 3 grandes phases :

#### **I -4-1-Etape d'initiation :**

Une tumeur cancéreuse correspond à une prolifération anormale de certaines cellules. Elles se divisent de manière incontrôlée et vont échapper à toute régulation. La survenue et la progression de la tumeur maligne résultent d'une accumulation d'événements génétiques complexes altérant le fonctionnement de certains gènes contrôlant la prolifération et la division de la cellule normale. Les gènes considérés comme impliqués dans le processus tumoral sont de trois types : les oncogènes, les anti-oncogènes et les gènes de maintien de l'intégrité (les *care takers*)<sup>16</sup>. Les oncogènes ou proto-oncogènes vont, par activation ou par surexpression, stimuler la division ou rendre la cellule immortelle (HER2, RAS, MYC, etc.). Les anti-oncogènes vont inhiber l'apoptose cellulaire (p53, WT1, etc.), par mutation ou par inactivation. Les gènes de maintien de l'intégrité de la cellule codent pour un complexe multifonctionnel chargé de surveiller l'intégrité du génome (MSH2, MLH1)<sup>17</sup>. Une inactivation ou une mutation de ces gènes peut engendrer une susceptibilité accrue aux cancers par instabilité génétique. Toutefois, tout gène qui intervient dans le contrôle de la division cellulaire peut, si son fonctionnement ou sa structure est modifié, être à l'origine d'une croissance cellulaire anormale.

La cellule initialisée n'est pas encore considérée comme une cellule cancéreuse car elle n'a pas encore acquis une autonomie de croissance. La phase de promotion qui suit va consister à sélectionner un clone et lui permettre de s'expander. Elle se caractérise par le maintien des modifications génétiques au sein de la cellule et par la sécrétion de promoteurs tumoraux tels que des cytokines, des facteurs de croissance au niveau de l'environnement tumoral. Cette phase par conséquent va aboutir à une transformation cancéreuse. Les cellules cancéreuses vont alors acquérir de nouvelles fonctionnalités<sup>16</sup>.

I -4-1-1- Caractéristiques d'une cellule cancéreuse :

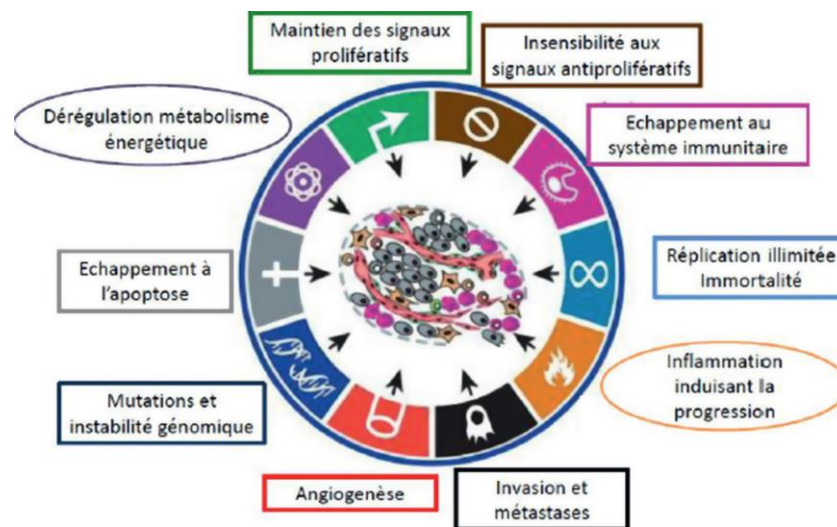


Figure 7 : Caractéristiques acquises des cellules cancéreuses<sup>18</sup>.

- indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération.
- capacité d'invasion et de dissémination cellulaire.
- capacité d'induire l'angiogenèse.
- potentiel illimité de réplication.
- résistance à l'apoptose .

I -4-2-Étapes de progression et d'invasion tumorale :

La phase de progression est principalement représentée par une prolifération des cellules sélectionnées et différenciées précédemment. En parallèle, grâce à l'ensemble des caractéristiques acquises décrites ci-avant, les cellules cancéreuses possèdent aussi la capacité de disséminer grâce à un phénotype plus agressif et invasif<sup>16</sup> .

**Chapitre II : l'évaluation de la génotoxicité : principe et protocole de test micronoyau**

pour la surveillance du risque mutagène/cancérogène, Les tests de génotoxicité sont appliqués depuis longtemps dans le monde chez des travailleurs exposés à des agents génotoxiques. Ils sont un outil, le seul pour l'instant, pour pouvoir évaluer les effets précoces, prédictifs du risque de cancer, de l'exposition à des agents génotoxiques<sup>19</sup>. il n'existe pas un, mais plusieurs tests de mutagenèse susceptibles de révéler tels ou tels types de lésions ou de mutations. Le choix des tests de toxicologie génétique doit se faire en



fonction du mode d'action d'un agent génotoxique ( par exemple le caractère aneugène (induisant des pertes de chromosomes) d'une substance est évalué au mieux par le test des micronoyaux (MN)<sup>20</sup> .

Plusieurs tests de génotoxicité se sont développés et peuvent être classés en trois grandes catégories :

### II -1- Les tests de mutation génique :

regroupant les variantes du test Ames. Ce test biologique permet de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique par l'évaluation de la facilité par laquelle une substance induit une réversion dans l'expression des gènes. Ce test utilise des bactéries et pour l'appliquer chez l'Homme, des variantes se sont développées pour analyser des effluents industriels, des gaz d'échappement, de l'eau potable ou des liquides biologiques humains .

### II -2- Les tests d'altération primaire et de réparation de

#### l'ADN :

comportant la détection des adduits à l'ADN, le test COMET et le test des ÉCS. Pour l'analyse des adduits à l'ADN, la chromatographie en phase liquide à haute performance est utilisée. Les composants de l'ADN sont séparés selon leur vitesse de migration et entraînés le long d'une colonne (phase stationnaire) à l'aide d'un solvant mobile. La détection des adduits se fait ensuite par spectrométrie de masse, une méthode de mesure des molécules ionisées, selon leur rapport masse/charge. Le test COMET (ou SCGE pour *Single Cell Gel Electrophoresis*) est une simple méthode d'analyse simple des cassures des brins (simple-brin et double-brin) d'ADN induites par un agent génotoxique, en utilisant l'électrophorèse sur microgel d'agarose avec des cellules isolées. Quand l'ADN a subi des cassures, le noyau prend la forme d'une queue de comète, détectée par microscopie en fluorescence. Le test des échanges entre chromatides soeurs (ÉCS), quant à lui, est un test standard qui se base sur la réplication semi-conservative des brins d'ADN et se fait sur des chromosomes métaphasiques. La méthode consiste à substituer la thymidine normale de l'ADN par la bromodéoxyuridine (BrdU) et les cellules sont incubées pour deux cycles de réplication . À la fin, un chromosome possède une chromatide contenant toujours le brin de la cellule parentale (coloré en foncé au Giemsa) et une chromatide avec deux brins substitués (couleur pâle au Giemsa) qui est moins



condensée à cause de l'incorporation du BrdU et plus susceptible à la dégradation par photolyse. Les ÉCS sont alors dénombrées au microscope.

### II -3- Les tests de mutation chromosomique :

comprenant le test des micronoyaux (MN) et le test des aberrations chromosomiques (AC). Le test des MN consiste à dénombrer des entités formées par cassures ou dommages chromosomiques, après l'exposition des cellules à un agent génotoxique, lors de la division cellulaire. Le test des AC, quant à lui, permet d'étudier les cassures et les remaniements dans les chromosomes sur des cellules en métaphase suite à l'exposition à des agents génotoxiques. Les tests utilisés pour évaluer le potentiel génotoxique d'une substance, doivent être validés à l'échelle internationale, en fonction du mode d'action de l'agent génotoxique étudié. Pour conclure à la génotoxicité d'un agent chimique, les résultats de plusieurs tests, à la fois *in vitro* et *in vivo*, doivent être pris en considération.

Plusieurs groupes et associations ont établis des normes pour ces tests standards, notamment l'Union Européenne (EU) et l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économique (OCDE)<sup>21,22</sup>.

### II -4-Test micronoyau :

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

le test des MN est le plus souvent réalisé sur des lymphocytes sanguins, les dommages à l'ADN pourraient y être moins fréquemment observés que dans les cellules cibles d'un agent génotoxique potentiellement cancérigène<sup>22</sup>.

#### II -4-1- Historique du test :

L'observation des micronoyaux en tant qu'indicateur de génotoxicité est apparue dans les années 1940<sup>23</sup>, mais initialement, seul le test *in vivo* sur érythrocytes de mammifères avait été approuvé par l'OCDE (OCDE LD474) en 1983. Le dénombrement était fait le plus souvent sur des des prélèvements de moelle osseuse ou de sang périphérique chez le rongeurs. C'est seulement depuis 2010 que l'OCDE a approuvé l'utilisation *in vitro* de ce test sur cellules de mammifère en culture primaire (lymphocytes) ou de lignées cellulaires dans un cadre réglementaire<sup>24</sup>.

### II -4-2 -Définition et objectif :

Le test du micronoyau pratiqué *in vivo* chez les mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité et en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il évalue la formation de micronoyaux dans des érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs<sup>25</sup>. Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite. Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique<sup>25</sup>.

Les test des micronoyaux a donc pour objet de détecter et numérer ces micronoyaux, dans des cellules traitées *in vitro* par l'agent génotoxique ou provenant d'une exposition *in vivo* (par exemple des lymphocytes de rongeurs ou de sujets humains exposés à l'agent génotoxique).

### II -4-3- Principe et protocole de test des Micronoyau :

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Si l'on utilise la moelle osseuse, les animaux sont euthanasiés aux moments appropriés après le traitement ; la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée . Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé aux moments appropriés après le traitement ; les préparations sont ensuite réalisées et colorées . Lors d'une administration aiguë du traitement, il importe d'effectuer le prélèvement de moelle osseuse ou de sang périphérique à un moment où l'induction d'érythrocytes immatures micronucléés par le traitement peut être détectée. Dans le cas d'un prélèvement de sang périphérique, un laps de temps suffisant doit s'être écoulé pour que ces éléments apparaissent dans la circulation sanguine. Les préparations sont analysées en vue de la détection de micronoyaux, par visualisation directe à l'aide d'un microscope, par analyse d'image, par cytométrie en flux ou par cytométrie à balayage laser<sup>25</sup>

Les sources de variabilité pouvant influencer la formation ou la fréquence des MN sont nombreuses. D'abord, une variabilité inter-laboratoire existe, car les protocoles, méthodes ou critères d'analyse des MN peuvent être différents. C'est pourquoi un effort international est en marche afin de mettre au point un protocole normalisé<sup>26</sup>.

### II -5-1-Description de la méthode d'essai:

#### a)-Sélection des espèces animales :

Il convient d'employer des souris, des rats, ou toute autre espèce de mammifère appropriée ; scientifiquement justifié dans le rapport. En général on choisit des souches d'animaux : jeunes, en bonne santé, et dont la moelle osseuse se divise activement.

#### - Préparation des animaux :

On choisit habituellement des animaux qui sont répartis de manière aléatoire entre les groupes témoins et les groupes de traitement.

#### - Préparation des doses :

les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous plusieurs formes en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

#### - Conditions de l'essai :

##### Solvant/véhicule :

Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les substances chimiques d'essai. une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin pour le solvant/véhicule.

#### b) Témoins :

##### - Les Témoins positifs :

Chaque essai doit normalement inclure un groupe d'animaux traités avec une substance chimique utilisée comme témoin positif.

##### - Les Témoins négatifs :

Pour chaque moment d'échantillonnage, il faut inclure un groupe d'animaux témoins négatifs, qui seront manipulés de la même façon que les groupes traités, mais ne recevront

pas le produit chimique d'essai. Si un solvant/véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, ce solvant/véhicule doit être administré au groupe témoin.

### II -5-2- Mode opératoire :

#### **Nombre et sexe des animaux :**

En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles, et la plupart des études pourrait donc être réalisée, La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés.

#### **Niveaux de dose :**

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude

#### **Administration des doses :**

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition, Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s)<sup>25</sup>

#### **a) Traitement :**

Il faut d'abord comprendre le processus de l'érythropoïèse chez les animaux de laboratoire, qui est un processus permettant la formation des globules rouges ou érythrocytes. Les globules rouges murins ont une durée de vie de 40 jours. Ils nécessitent un renouvellement permanent afin de maintenir l'homeostasie de système. Chez la souris adulte, ce renouvellement quotidien est assuré par l'érythropoïèse médullaire. Dans le cas des souris, l'expulsion du noyau de l'érythroblaste se fait après environ 6h de la dernière mitose, le stade des PCE dure dans la MO 12 à 24h, et une même période dans le sang périphérique où les PCE se déplacent et deviennent matures, les NCE des souris persistent dans le sang périphérique pour environ 1 mois. Les PCE sont donc des cellules nouvellement formées, les micronoyaux observés dans ces cellules sont induit par un traitement chimique (médicamenteux) administré durant un cycle cellulaire récent.

Le premier prélèvement ne doit pas se faire avant 24h de la dernière administration, la période de latence du cycle cellulaire et la durée du stade PCE assurent que même les substances les plus rapides à agir ne seront détectables qu'à ce moment<sup>27</sup>.

### **b) Le temps des prélèvements:**

Les informations obtenues confirment que les pics de la fréquence des micronoyaux souvent apparaissent à des temps > 30h voire même 60h, on recommande donc que le premier prélèvement soit réalisé à 24-36h après le dernier traitement <sup>27</sup> .

### **c) Sélection de dose :**

Les MN sont généralement induites à des doses toxiques proches de la létalité, cependant, plusieurs exceptions existent. Il est recommandé que la dose la plus élevée soit la dose maximale tolérée (DMT) pour augmenter la probabilité de détection d'un clastogène. La dose la plus faible utilisée ne doit pas être <50% de la DMT <sup>27</sup> .

La DMT est mal définie, en pratique, c'est la dose maximale compatible à la survie des animaux, elle peut être déterminée par une étude pilote en fonction d'une toxicité sévère liée à la substance testée, se manifestant par des conséquences autres que la mort :

- dans le cas d'un test sur MO, la DMT est atteinte lorsque le ratio PCE /NCE<10%
- si le test est fait sur SP, elle est atteinte lorsque le ratio des réticulocytes/érythrocytes totaux est de 90% inférieur à celui de témoin négatif <sup>28</sup> .

### **d) Administration des doses :**

### **e) Préparation de la moelle osseuse et du sang :**

Les cellules de moelle osseuse sont généralement obtenues à partir des fémurs ou tibias des animaux, immédiatement après l'euthanasie. De faibles volumes de sang périphérique peuvent être prélevés de l'animal d'essai, soit selon une méthode permettant la survie de l'animal d'essai (par exemple prélèvement dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié), soit par ponction cardiaque ou prélèvement sur un vaisseau sanguin principal, après l'euthanasie de l'animal. Pour les érythrocytes provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique, on peut effectuer des frottis qui sont ensuite colorés pour analyse microscopique, ou fixés puis colorés de manière idoine pour analyse par cytométrie en flux. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN peut éliminer une partie des artefacts associés à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'utilisation de colorants classiques (par exemple le Giemsa pour l'analyse microscopique<sup>25,28</sup> .

### **f) Analyse (manuelle et automatique) :**

Dans le test de micronoyaux, la fréquence des PCE micro-nucléés constitue le but primordial, et la fréquence des PCE un support pour évaluer la cytotoxicité.

Dans les méthodes manuelles, toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope, et 2000 PCE / animal sont évalués pour la présence de micronoyaux. L'unité d'analyse est le PCE et non les micronoyaux étant donné qu'un PCE peut contenir plus qu'un micronoyau.

Pour la toxicité de la MO, au moins 200 érythrocytes sont évalués par animal pour la proportion des PCE dans la MO et 1000 dans le sang périphérique. Sur les lames, le pourcentage des érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes ne doit pas être inférieur à 20 % de la valeur des témoins. Dans les études automatisées (cryométrie de flux) le nombre de cellules évaluées peut être beaucoup plus élevé jusqu'à 100.000 érythrocytes au total, et les proportions des PCE, NCE, PCE micro-nucléés, NCE micro-nucléés peuvent être quantifiées en fonction du but de l'étude.

### II -5-3- Résultats :

#### a) Traitement des résultats :

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micro-nucléés et la proportion d'érythrocytes immatures doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Si des souris sont traitées en continu pendant au moins quatre semaines, il convient de fournir également les données relatives au nombre et à la proportion d'érythrocytes matures micro-nucléés, si elles ont été recueillies. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles-aussi être consignées.

#### b) Évaluation et interprétation des résultats :

-des résultats positives obtenue au cours d'un test de MN indique que la substance induit la formation de MN qui résulte de lésion de chromosome ou de lésion de l'appareil mitotique dans les érythroblastes de l'espèce soumise à essai. Des résultats négatifs indiquent que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas la formation de MN dans les érythrocytes immatures de l'espèce testée.

-pour dire avec certitude qu'un test de micronoyau est négatif, il faut qu'il réponde aux critères suivants:

- 1/ une dose de traitement qui n'est pas inférieure de 50% de la dose maximale tolérée.
- 2/ des PCE prélevés à 2 temps du traitement à écart de 24h, dans un intervalle de 24 -60 heures.
- 3/ 2000 PCE dénombrés par échantillon et obtenus à partir d'au moins 3 males et 3 femelles pour chaque niveau de dose et chaque temps de prélèvement.

4/ un témoin positif.

Une seule expérience répondant à ces critères est suffisante pour démontrer un résultat négatif.

-un résultat est positif s'il y a un accroissement, lié à la dose, du nombre de MN ou une augmentation nette des MN dans un groupe de traitement à un seul temps de prélèvement. Hors ces critères, la substance n'est pas mutagène<sup>25</sup>.

### **Chapitre III : substance antimutagénique : définition et mécanisme**

#### **III-1-Définition :**

L'anti-mutagenèse est définie comme étant la diminution en réponse à de facteurs exogènes, du taux des mutations spontanées ou induites<sup>29</sup>. Les antimutagènes et les anticarcinogènes sont des substances naturelles ou synthétiques capables d'inhiber ou de réduire l'altération spontanée ou induite de l'ADN. Ces inhibiteurs agissent à différents niveaux, de la pénétration du xénobiotique à l'expression de la mutation et au cancer. Ils agissent au niveau extracellulaire comme intracellulaire, ils réagissent directement avec les mutagènes ou sur les processus menant à leur activation. Les antimutagènes et les anticarcinogènes agissent aussi sur le processus de la réparation de l'ADN<sup>30,31</sup>. Il y a deux types principaux d'antimutagènes.

#### **III-2-Les types d'antimutagènes :**

##### **III-2-1-Les Desmutagènes :**

Ce sont des facteurs qui agissent sur l'agent mutagène sans affecter la cellule en inactivant directement l'agent mutagène ou en inhibant l'activation métabolique des mutagènes indirects<sup>32</sup>.

##### **III-2-2- les Bioantimutagènes :**

Si les desmutagènes interviennent au niveau du mutagène directement ou indirectement (promutagène, activation métabolique), il existe des agents qui réduisent la fréquence des

mutations spontanées ou induites en agissant sur les procédures de mutation dans la cellule qui a déjà été exposée aux mutagènes. Ces agents sont appelés BIOANTIMUTAGÈNES . On les trouve en bon nombre dans notre alimentation. Remarquons que le terme de biomutagène a été ainsi donné aux agents mutagènes biologiquement actifs <sup>33,34,35</sup>.

### **III-3-Les mécanismes d'action d'antimutagènes :**

#### **III-3-1-Les mécanismes d'action des Desmutagènes :**

Les mécanismes d'action connus des desmutagènes sont :

- inactivation chimique ou enzymatique des mutagènes
- adsorption des mutagènes par une substance de haut poids moléculaire: c'est une inactivation physique,
- inhibition de l'activation métabolique des pro-mutagènes
- inhibition de la formation des mutagènes à partir de leurs précurseurs<sup>36</sup>.

Dans l'état actuel des recherches, la présence d'inhibiteurs de l'activation métabolique réduit souvent la fréquence des tumeurs chez les animaux traités par des carcinogènes. Une situation similaire existe pour les inhibiteurs dans la formation de mutagènes à partir des précurseurs. Un exemple bien connu est celui de la vitamine C qui inhibe la formation de nitrosamines à partir des nitrites et amines . Quand les mutagènes agissent comme initiateurs de cancer, la plupart des desmutagènes sont considérés comme étant des anticarcinogènes dont les modes d'action impliquent les modèles suggérés précédemment de desmutagénicité à l'extérieur et à l'intérieur de l'animal et du corps humain <sup>37,38,39</sup>.

#### **III-3-2-Les mécanismes d'action de bioantimutagènes :**

\*Les agents qui augmentent la fidélité de réplication de l'ADN.

\*les agents permettront la promotion de la réparation des endommagements de l'ADN<sup>34</sup> : Certains bioantimutagènes réduisent la fréquence des mutations induites en promouvant la réparation des endommagements de l'ADN . Il existe deux catégories de ces bioantimutagènes :

- ceux qui travaillent non spécifiquement quant à l'origine des dégâts causés sur l'ADN.
- ceux qui sont effectifs vis-à-vis un endommagement spécifique de l'ADN.

\*Les agents inhibant la réparation prédisposée à l'erreur.



DESMUTAGENES

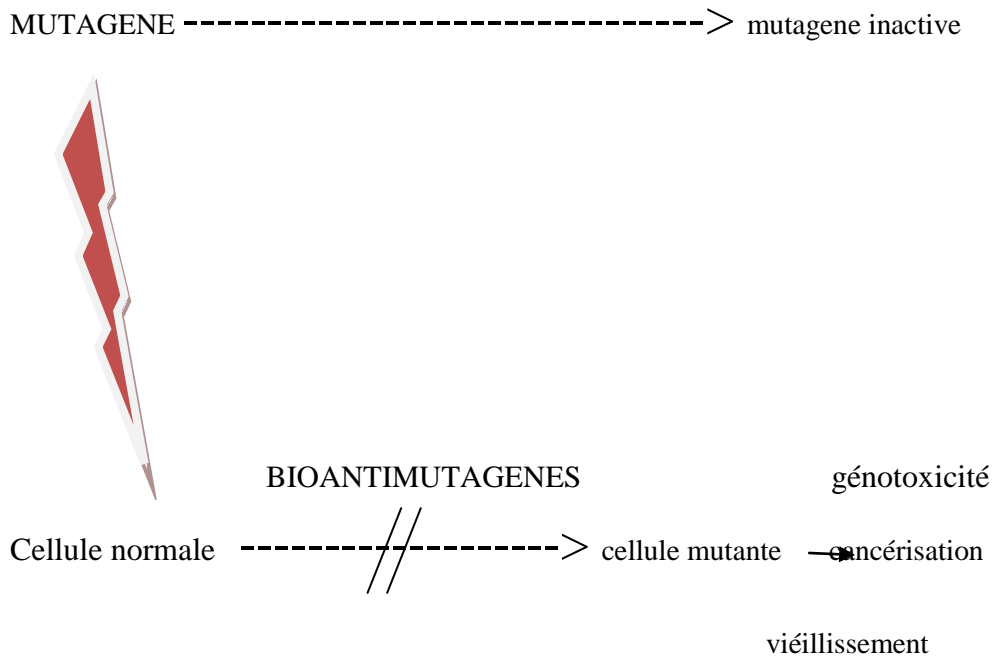


figure 8 :Concepts de desmutagènes et bioantimutagènes<sup>40</sup>.

## Chapitre IV :l'intérêt du test micronoyau dans l'évaluation de l'activité antimutagénique

Comme le cancer ne se déclare qu'après un temps de latence, il est essentiel de développer des biomarqueurs précoces qui peuvent aider à déterminer et à prévenir les risques génotoxiques. La validation d'un simple biomarqueur demande de longues périodes d'étude depuis le développement et la standardisation du protocole de recherche, jusqu'à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de ce biomarqueur comme prédicteur de risque de cancer. le test des MN gagne de plus en plus en popularité parce qu'il est plus facile à réaliser<sup>22</sup>.

### IV-1-définition et classification des biomarqueurs :

un biomarqueur est un indicateur biologique (protéine, métabolite, caractéristique biologique, etc.) qui permet de mesurer, au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique, l'exposition à des agents chimiques polluants. Les biomarqueurs les plus utilisés dans le développement de stratégie de prévention des cancers sont classés en trois catégories :

### **IV-1-1-Les biomarqueurs d'exposition :**

ils permettent d'évaluer la pénétration d'une substance exogène dans l'organisme par le dosage de la substance elle-même ou de ses métabolites<sup>22</sup>.

### **IV-1-2-Les biomarqueurs d'effet :**

ils mettent en évidence une interaction entre des agents génotoxiques et le matériel génétique de la cellule. Les biomarqueurs d'effets les plus utilisés sont des marqueurs biochimiques, tels que les adduits à l'ADN ou aux protéines, et des marqueurs cytogénétiques comme les MN et les AC. Parmi les biomarqueurs d'effet, deux types sont cités :

**a-Les biomarqueurs de prévention** : comme son nom l'indique, sont plus utilisés pour la prévention en biologie médicale dans l'identification et le calcul d'un risque ou d'une prédisposition

pathologique. Ce terme est plus employé dans la recherche sur le cancer. Quant aux biomarqueurs de prédiction, ils prédisent le développement d'une maladie et peuvent aider à implanter des programmes de prévention.

**b-Les biomarqueurs de susceptibilité** : ils permettent d'expliquer les différences interindividuelles dans la réponse à une exposition génotoxique, résultant du polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la réparation des lésions de l'ADN<sup>41</sup>.

L'utilisation de ces biomarqueurs est basée sur le fait que la plupart des cancérogènes reconnus chez l'homme sont génotoxiques après une courte exposition et sont capables d'induire des dommages chromosomiques<sup>42</sup>. La classification des biomarqueurs par Sari-Minodier en 2005 place les MN comme type de biomarqueur de prédiction compris dans le groupe des biomarqueurs d'effet<sup>41</sup>.

### **IV-2-La définition et l'origine du MN :**

Un micronoyau est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger comme « un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales des chromosomes ».

Suite à l'action de substances clastogènes et/ou aneugènes, des micronoyaux peuvent apparaître dans le cytoplasme des cellules. Le test de MN permet la détection d'aberrations nucléaires indiquant des dysfonctionnements cellulaires<sup>23</sup>. Les MN, connus également sous le

terme de corps de Howell- Jolly par les hématologistes, . Elles peuvent être, soit le témoin d'une instabilité génétique, soit un bio marqueur d'effet mettant en évidence des dommages chromosomiques induits par des agents mutagènes/cancérogènes.

Les MN sont générées par la perte de matériel génétique au cours de la division cellulaire : ils contiennent des fragments chromosomiques acentromériques et/ou des chromosomes entiers non intégrés dans les noyaux fils au cours de la mitose . Les fragments chromosomiques acentromériques (MN acentromériques) sont consécutifs à des cassures doubles brin de l'ADN et ne peuvent pas se rattacher au fuseau mitotique, faute de centromères (résultats d'un événement clastogène). La perte de chromosomes entiers (MN centromériques) résulte, quant à elle, d'altérations au niveau des structures impliquées dans la ségrégation et la migration des chromosomes (événement aneugènes). Lors de la télophase, une enveloppe nucléaire se forme autour de ces fragments perdus ou de ces chromosomes isolés et donne, ainsi, naissance à une entité ayant la morphologie d'un noyau en interphase, mais de taille plus petite d'où le terme de « MN ».

Les anomalies chromosomiques de structure (événements clastogène) s'inscrivent parfaitement dans la phase d'initiation du processus cancérogène. Les anomalies chromosomiques de nombre (événements aneugènes) s'inscrivent dans les phases d'initiation et/ou de promotion, l'aneuploïdie étant un événement s'inscrivant dans la cadre de l'instabilité génétique et retrouvé de manière ubiquitaire dans les cellules tumorales<sup>5</sup> .Cependant, les MN représentent non seulement des pertes chromosomiques, mais également le résultat de l'amplification de l'ADN .L'amplification de l'ADN est couramment observée dans les processus oncogéniques, donnant lieu à des chromosomes doubles (DM), qui sont retirés du noyau de la cellule principale, à l'origine des MN. L'expulsion des MN est associée à la perte de dose d'allèle, contribuant à l'état cancérogène<sup>43</sup> .

#### **IV- 3- l'intérêt de test MN :**

Dans l'élaboration d'un programme de biosurveillance de l'exposition à des agents génotoxiques, il faut se souvenir que l'effet induit ne survient, en général, qu'après une longue période d'exposition. Il est donc important de pouvoir détecter le plus tôt possible les premières altérations causées par cette exposition<sup>44</sup> .

C'est pourquoi des biomarqueurs d'effet précoce ont été développés. . Un de ceux-ci, le test des MN, est extensivement utilisé en cytogénétique et en épidémiologie moléculaire. A` partir de ce développement technologique, l'emploi du test des MN dans les protocoles de bio surveillance a considérablement augmenté sur les cinq continents ; la plupart des travaux

ont concerne la surveillance des populations professionnellement exposées à divers environnements mutagènes et potentiellement cancérigènes<sup>22</sup>.

Donc les MN figurent, à l'heure actuelle, en bonne place parmi les biomarqueurs appliqués dans de nombreuses situations à risque de cancer parmi lesquelles se retrouvent les expositions professionnelles<sup>45</sup>. en effet le test MN est valable pour les deux variantes du test, toxicologique (effet mutagène) et pharmacologique (effet antimutagène), c à d ce test a une double signification ; L'évaluation de l'activité mutagène est justifiée par l'augmentation significative des taux d'hématies micronucléées suite à l'exposition des souris à des agents genotoxiques comparé à un témoin négative, par ailleurs, l'activité antimutagène est démontré par la diminution statistiquement significative des taux d'hématies micronucléées après exposition à des agents génotoxiques ainsi que des substances à tester (substance à prévenir une lésion mutagène)<sup>46</sup>.

Plusieurs études relient la formation accrue des MN et la survenue du cancer et beaucoup d'arguments appuient cette hypothèse<sup>47</sup>. Comme les AC sont reconnues comme un biomarqueur de risque de cancer, la similitude existant entre les mécanismes de formation des MN et des AC, permet de suggérer un lien de causalité entre les MN et le cancer. Ainsi, une augmentation de la fréquence des MN est observée chez des patients cancéreux (non traités) souffrant de tumeurs sporadiques et chez des patients porteurs d'une mutation dans les gènes impliqués dans les syndromes d'instabilité chromosomique comme l'ataxie-télangiectasie et le syndrome de Bloom; ces syndromes sont associés à un risque modéré ou sévère de cancer<sup>22</sup>.

De plus, une corrélation existe entre la fréquence des MN et la concentration sanguine de folates, dont la carence est associée à un risque élevé de cancer, particulièrement de cancer colorectal. Par ailleurs, ces folates sont essentiels à la synthèse d'une des bases de l'ADN, et leur carence ralentit la synthèse de l'ADN pouvant favoriser l'apparition d'erreurs lors de la réplication, par incorporation erronée d'uracile.

Également, une étude sur le cancer du col utérin a pu établir un lien direct entre une augmentation de la fréquence des MN dans les cellules cervicales du col et les premières étapes de la cancérogenèse à ce site.

Finalement, la méta-analyse des résultats obtenus lors de la réalisation du test des MN dans plusieurs cohortes européennes atteintes de cancer en général, dans le cadre des collaborations

internationales à la base des projets HUMN et *Cancer Risk Biomarkers*, a permis de démontrer un lien de causalité entre les MN et le cancer. Cette méta-analyse consiste à rassembler des données provenant d'études pertinentes et à les analyser au moyen des tests statistiques adéquats. Elle a démontré que les sujets ayant une fréquence élevée de MN (fréquence observée dans le tiers supérieur de la population) ont plus de risque de développer un cancer dans les 12 à 15 années suivant la réalisation du test<sup>22</sup>.

les MN représentent les effets directs des agents causant une augmentation du risque de cancer, ces effets sont considérés comme étant en amont du processus cancérogène, donc les MN

peuvent être considérés comme un biomarqueur de prédiction. Pour pouvoir évaluer l'exposition aux effets adverses des polluants et détecter de façon précoce les risques pour la santé<sup>48</sup>. la détermination des MN est particulièrement importante quand ce test est utilisé pour la surveillance des effets génotoxiques chez l'homme. Parce que les micronoyaux constituent un dommage stable et persistant (effet mutagène) qui persiste dans la cellule pendant la durée de vie de celle-ci, et il a donc une rémanence longue ; le test des micronoyaux a d'ailleurs été présenté récemment comme ayant une valeur prédictive pour le risque de cancer. Le test des micronoyaux peut être aussi utile pour évaluer une exposition récente (heures, jours)<sup>22</sup>.

Une grande attention et des efforts sont actuellement versés à la recherche et l'étude des plantes médicinales, y compris l'évaluation de leurs effets nocifs potentiels<sup>49</sup>, ainsi que leur effets protecteurs.

Les plantes médicinales ont été largement utilisées par les hommes anciens et modernes de toutes les cultures pour traiter différents maux. Une seule plante traitée dans différentes formulations peut être utilisée pour soigner un large éventail de maladies. Cependant, le rôle historique des herbes médicinales dans le traitement et la prévention des maladies et dans le développement de la pharmacologie ne présume pas de leur innocuité pour une utilisation non contrôlée par un public non informé. Des études de génotoxicité et d'anti-génotoxicité peuvent aider à évaluer l'innocuité et l'efficacité des produits à base de plantes médicinales<sup>49</sup>.

Dans cette but Le test du micronoyau a été réalisé par Ângela Giovana et al en 2016 afin d'étudier l'effet protecteur de la pulpe de copaïba contre le clastogénicité induit par le cyclophosphamide (CP)<sup>50</sup>. Des études similaires ont été rapportés par Alvarez-

González en 2001, qui ont montré un effet inhibiteur modéré de naringine sur le MN produit par l'ifosfamide. Les principaux objectifs de cette étude sont : (1) déterminer si Nar avait un effet génotoxique chez la souris in vivo. Ceci a été évalué en mesurant le taux d'érythrocytes polychromatiques micronucléés (MNPCE); (2) de déterminer son potentiel antigénotoxique et anticytotoxique sur les dommages produits par l'ifosfamide. La première étude a été réalisée en notant le taux de MNPCE et la seconde en établissant l'indice érythrocytes polychromatiques / normochromatiques (PCE / NCE)<sup>50</sup>.

une autre étude a été réalisée par Juliana Carvalho en 2010 montre que Le traitement simultané avec une dose unique de *pulpe d'acai* a provoqué une diminution statistiquement significative de la fréquence des MNPCE induite par le DXR dans la moelle osseuse et le sang périphérique des souris, par rapport au groupe traité avec le DXR seul.

en plus des agences de réglementation telles que « FDA », (EMA) ont commencé à exiger des tests de génotoxicité en tant que partie essentielle de la validation d'un médicament<sup>52</sup>.

### **Chapitre V: aspects botanique et phytochimique de *Tilia cordata*.**

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française note 1 comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une «drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais.

L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments<sup>53</sup>.

Nous avons axé notre travail sur l'évaluation de l'effet antimutagène d'une plante médicinale : *tilia cordata*. Le choix de cette plante a été guidé par leurs usages dans la pharmacopée traditionnelle et par les études chimiques répertoriées dans la littérature. Nous proposons avant de présenter nos résultats de donner une revue de la littérature sur cette plante.

#### **V-1-Etymologie :**

Le nom générique vient directement du latin lui-même dérivé du grec Tilos qui désignait les fibres de l'écorce interne (liber) utilisées pour faire des ficelles et des cordes de grande qualité .

### V-2-Données botaniques générales de famille de tiliacées :

Les Tiliacées sont une famille d'arbres, d'arbustes et de rares plantes herbacées, des régions tempérées à tropicales comprenant 450 espèces réparties en plus de 50 genres<sup>50</sup> Tous ces tilleuls possèdent des feuilles en forme de cœur (cordiformes), des inflorescences aux fleurs blanc-jaunâtres en grappes pendantes très parfumées dont les bractées membraneuses vert clair ou jaune sont bien développées. La floraison a lieu en fin de printemps et début d'été (fin mai-juin-juillet), elle est courte et dépend de la variété du tilleul et de sa localisation géographique.

Les principales espèces européennes que l'on apprécie et utilise en phytothérapie sont :

- Le tilleul à petites feuilles : *Tilia cordata* = *Tilia sylvestris*.
- Le tilleul à grandes feuilles : *Tilia platyphyllos*.
- L'hybride de ces deux espèces, le tilleul commun : *Tilia vulgaris*<sup>55</sup>.

### V-3-Caractéristiques botanique de l'espèce *tilia cordata* :



Figure 9:Le tilleul à petites feuilles. © Waugsberg, GNU Free Documentation License version 1.2<sup>5657</sup>

*Tilia cordata* est un arbre tempéré de grande taille à feuilles cordiformes. Préférant les sols calcaires, il atteint trente mètres, mais il peut dépasser quarante mètres de haut . Il s'hybride facilement avec *Tilia platyphyllos*, espèce que l'on trouve le plus souvent sur le bord des routes. Le tilleul est connu pour ses vertus phytothérapeutiques, notamment avec l'ensemble bractée et inflorescence. Cette dernière est fixée sur une bractée vert pâle, voire jaune clair.<sup>3</sup>



La cime de cette espèce est large en coupole, présentant des branches ayant tendance, avec l'âge, à retomber. Son écorce gris verdâtre se craquelle en vieillissant<sup>56</sup>.

### V-3-1-Classification botanique :

- Reigne : *Plantae* (Plants)
- Classe : *Magnoliopsida* (Dicotylédones)
- Ordre : *Malvales*
- Famille : *Tiliaceae* ( famille du tilleul)
- Genre : *Tilia L.*
- Espèce : *Tilia cordata Mill*<sup>58</sup>

### V-3-2-Répartition géographique :

Le potentiel d'adaptation locale d'une espèce à des conditions climatiques et de sol particulières est supposé dépendre de la variation génétique au sein de ses populations et entre celles-ci.

*Tilia Cordata* est originaire d'Europe<sup>59</sup>, elle est présent dans presque toute l'Europe, des îles britanniques à la Russie. En France, il pousse à l'état spontané dans les régions de plaines et de collines, surtout en Alsace et en Lorraine<sup>56</sup>.



En générale Le tilleul est présent dans les zones tempérées de l'hémisphère nord (il est présent naturellement dans les forêts et le plus souvent planté dans des parcs, des jardins, des rues et des routes)<sup>60</sup>. Il fut l'un des arbres choisis en 1792 pour incarner les valeurs de la Révolution française<sup>56</sup>.

### V-3-3- Les composition botanique :

le tableau 2 fournit une description de composition botanique de *Tilia cordata*

Les composants	Descriptions	Photo
----------------	--------------	-------



<p><b>feuille</b></p>	<p>-petite, généralement 4-7cm; pétiole et face supérieure du limbe glabres , face inférieure glabre entre les nervures, avec des touffes de poils roux à l'aisselle des nervures (encore blancs au débourrement!)</p> <p>-face inférieure du limbe plus claire que la supérieure, glauque à gris-vert à maturité; limbe plus coriace<sup>63</sup></p> <p>-elles sont très dentelées sur leur circonférence.</p> <p>- caduques <sup>56</sup></p>	 <p>Figure 10 :Feuille de <i>tilia cordata</i><sup>61,62</sup></p>
<p><b>inflorescence</b></p>	<p>-5-7 fleurs (jusqu'à 11)<sup>63</sup></p> <p>Ses inflorescences fourchues, en juin. Le pétiole de ces inflorescences est accompagné, à la base, par une feuille étroite et membraneuse qui forme par la suite l'appareil de</p>	 <p>Figure 11 :Fleur de <i>tilia cortata</i><sup>56</sup></p>


	<p>dissémination des petits fruits.</p> <p>-Les pétales de ses fleurs sont blanc jaunâtre, avec des akènes à parois minces et sphérique<sup>56</sup></p>	
<b>fruit</b>	<p>-capsule globuleuse, côtes peu marquées, paroi mince, facile à écraser graine lisse, sans cannelures<sup>63</sup></p> <p>-5 à 8 millimètres de diamètre<sup>56</sup></p>	

Figure 12 :les fruit de tilleul<sup>64</sup>

#### V-4-Composition phytochimique et leur effet :

Ces plantes contiennent un certain nombre de dérivés tels que les hydrocarbures, les esters, terpénoïdes, quercétine, kampférol, composés phénoliques, tanins condensés et scopolétine<sup>65</sup>

##### V-4-1-Les fleur :

tableau 3 :les composants phytochimiques de fleur et leur effet

Les composants phytochimique	Les composant dominants	Référence	Leur effets
<b>acides phénoliques</b>	<p>-acide chlorogénique</p> <p>- acide caféique</p> <p>-acide vanillique</p> <p>- acide p-coumarique<sup>66</sup></p>	<p>-Les teneurs totales en acides phénoliques et flavonoïdes ont été déterminées conformément à la Pharmacopée européenne 8<sup>66</sup>.</p>	<p>-l'acide caféique et l'acide chlorogénique se caractérisent par une activité antioxydante élevée<sup>66</sup></p>

		-La fleur de tilleul contient des acides phénoliques (acides caféique, p-coumarique et chlorogénique) <sup>67</sup>	
<b>flavonoïdes</b>	épicatéchine, astragaline, cosmosine, quercétine, tiliroside , kaempférol isoquercitrine, hyperoside et rutoside et leur glycoside <sup>56</sup> .	-La fleur de tilleul contient des flavonoïdes, principalement des glycosides de quercétine (rutine, hyperoside, quercitrine, isoquercitrine) ainsi que des glycosides de kaempférol (astragaline). <sup>67</sup> -Des études récentes indiquent que les extraits de fleurs d'espèces Tilia contiennent principalement des O-glycosides de flavonols, principalement des dérivés mono- et di-sucre de la quercétine et du kaempférol <sup>66</sup>	-Les flavonoïdes sont considérés comme le groupe de substances actives le plus important, déterminant l'activité pharmacologique de la tilleul 14 -le tiliroside (dérivé d'kaempférol), également présent en grande quantité chez différentes espèces de tilia , révèle un effet hépatoprotecteur <sup>66</sup> - Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux propriétés sédatives des fleurs de tilleul , les auteurs rapportent cette activité à des teneurs significatives en quercétine et

			<p>kaempférol ainsi que leurs dérivés dans les matières premières<sup>66</sup>.</p> <p>- des flavonoïdes dérivés du kaempférol (tiliroside) ou du quercétrol (quercétroside) antispasmodiques et légèrement anti-inflammatoires<sup>55</sup></p>
Huiles essentielles	<p>-des alcanes<sup>67</sup></p> <p>- terpènes (dessesquiterpène ;monoterpènes)<sup>55</sup></p> <p>- alcools et esters phénoliques<sup>68</sup></p>	<p>-La fleur de tilleul contient d'huile essentielle contenant des alcanes et des monoterpènes <sup>67</sup></p> <p>-Entre 0,05 et 0,1 % de terpènes que l'on peut extraire sous forme d'huile essentielle dont le farnésol(sesquiterpène) et un mélange complexe de mono terpènes non spécifiques du tilleul (linalol, géraniol, 1,8-cinéole (eucalyptol), carvone, camphre, thymol et carvacrol)<sup>55</sup></p>	<p>-Le farnésol, une substance présente dans l'huile volatile de tilleul, présente une activité sédatrice et antispasmodique sur le duodénum de rat in vitro <sup>67</sup>.</p> <p>-L'effet sédatif des fleurs de tilia peut également être lié à la présence d'huile essentielle dans cette matière première. Bouchbauer et ses collaborateurs en1992 indiquent que l'huile essentielle, lorsqu'elle est inhalée, présente un</p>

			effet calmant et que les composés responsables de cette activité comprennent le benzaldéhyde, l'alcool benzylique et le 2-phényléthano <sup>66</sup> .
Autres constituants	- mucilage -tanins condensés -acides aminés <sup>67</sup>	-La fleur de tilleul contient 31% de polysaccharides de mucilage, principalement des arabinogalactanes  Et 2 % de tanins condensés (procyanidin dimères B-2 et B-2) <sup>67</sup>  - Les acides aminés sont : alanine, cystéine, cystine, isoleucine, leucine, phénylalanine, sérine <sup>69</sup>	

### V-4-2-Les bractées :

Les bractées est riche en phénylacétaldéhyde et d'autre aldéhydes ,des mono- et sesquiterpènes oxygénés (linalol, géraniol, farnésol, libres et acétylés, camphre, carvone, cinéole), des alcools aromatiques (phényléthanol, alcool benzylique), des phénols et des alcanes<sup>70</sup>.

### V-4-2-L' aubier :

La composition de l'aubier de tilleul est assez mal connue (acides phénols, tanins, fraxoside, esculoside, acides aminés etc)<sup>71</sup>.

Tableau 4: recenser les composants phytochimiques de l'aubier de tilleul et leur effet

Composants phytochimiques dominants	Référence	Leur effets
	L'aubier de tilleul renferme	anti-inflammatoires et

-tanins et acides phénols	des composés phénoliques : tanins et acides phénols	antioxydants
-Des coumarines	L'aubier contient t d es coumarines comme des fraxoside et esculoside	-protecteur des petits vaisseaux sanguins, anti- inflammatoires et cholérétiques <sup>55</sup> .
- phloroglucinol.	plusieurs auteurs rapportent, sans référencer leur source, la présence de phloroglucinol 71	-antispasmodique <sup>55</sup>

### V -5-Usages médicaux :

Les extraits de Tilia ont plusieurs effets pharmacologiques, y compris les hépatoprotecteurs , sédatifs , anxiolytique , antinociceptive , antitumeur et anti-inflammatoire<sup>72</sup> .

Les inflorescences de tilleul (fleurs et bractées) et l'aubier de tilleul (bois tendre juste sous l'écorce) sont utilisés en phytothérapie

Tableau 5 : présenter l'usage médicale de tilleul

Composant phytochimique	Leur usage
Les inflorescences de tilleul	-La Commission E a approuvé la fleur de tilleul pour le rhume et la toux liée au froid. Le British Herbal Compendium indique son utilisation pour le catarrhe des voies respiratoires supérieures, le rhume, les toux irritables, l'hypertension et l'agitation . La licence allemande standard pour l'infusion de tilleul indique son utilisation pour soulager l'irritation de la toux causée par un catarrhe des voies respiratoires et pour les rhumes fiévreux pour lesquels un traitement contre la transpiration est souhaité .

	<p>-Lors des tests expérimentaux initiaux, des actions hypotensives et vasodilatatrices ont été observées chez des animaux recevant l'extrait de tilleul par voie intraveineuse. Leur fréquence cardiaque a augmenté et le tonus du muscle cardiaque s'est relâché . Cet effet sur le coeur a été un sujet de préoccupation. En quantité excessive, on sait que la fleur de tilleul est cardiotoxique <sup>67</sup>.</p> <p>-Sont apaisantes, sédatives du système nerveux central et antispasmodiques; elles peuvent atténuer l'anxiété (anxiolytique léger). Ce sont les propriétés traditionnelles du tilleul mais qui ont été confirmées par l'expérimentation (certains composés extraits des fleurs se lient aux récepteurs des benzodiazépines).</p> <p>- Légèrement diurétiques et peut-être hypotensives par un effet relaxant sur la musculature des vaisseaux sanguins<sup>55</sup>.</p>
l'aubier de tilleul	<p>-Les extraits d'aubier de tilleul sont légèrement antispasmodiques (principalement sur les voies digestives y compris les voies biliaires et la sphère urogénitale) .</p> <p>-L'augmentation de l'excrétion biliaire est appréciée pour faire baisser le taux de cholestérol sanguin, améliorer la digestion (surtout celle des corps gras) et plus simplement pour "nettoyer" l'organisme, le foie éliminant beaucoup de substances toxiques à travers le flux de bile, donc les</p>

	<p>extraits d'aubier de tilleul s'emploient surtout en cas de troubles fonctionnels des voies biliaires ,quand il n'y a pas d'obstacles (calculs) ou de rétrécissement organique .</p> <p>-Par ailleurs, la relaxation des muscles des vaisseaux sanguins peut dilater légèrement les coronaires et abaisser temporairement la pression artérielle.</p> <p>-Enfin une cure d'extrait d'aubier de tilleul permet de "détoxifier" l'organisme et d'améliorer des troubles variés : allergies alimentaires, eczéma, certaines inflammations articulaires, constipation d'origine hépatique, hypertension artérielle modérée <sup>71</sup>.</p>
--	---

Bien que les effets antimutagènes du tilleul n'aient pas été très étudiés, certains d'éléments entrant dans son profil phytochimique ont fait l'objet d'une littérature abondante relative à ces effets.

### **Chapitre VI : Potentiel antimutagenique de *tilia cordata***

Les recherches en sciences alimentaires et pharmaceutiques se tournent de plus en plus vers les nutraceutiques .les nutraceutiques ont été définis à l'origine par Dr Steve DeFelice de la « Fondation for Innovation in Médecine » en 1989 comme étant toute substance ,aliment ou partie d'un aliment qui procure des bienfaits pour la santé incluant la prévention et le traitement de maladies.

Les plantes constituent une source importante de nutraceutiques. en effet ,il est connu depuis des siècles que des dérivés d'origine végétale possèdent un large spectre d'activité biologique. plusieurs études ont illustré la présence d'une relation inversement proportionnelle entre la consommation de végétaux et l'incidence de maladies dégénératives,



tels le cancer , les maladies cardiovasculaires.d'autre effets bénéfiques contre les maladies ont été attribués à des composants végétales tels des effets anti-inflammatoire ,antiviral, antiallergique , antimutagène et antioxydant<sup>73</sup>.

Dans le cadre de l'évaluation des effets anti-mutagéniques des substances actives présentes dans le tilleul cités dans le chapitre 5, on va s'intéresser à savoir ses composants qui peuvent avoir des effets antimutageniques, principalement les composés phénoliques.

### **VI-1-Les Composés phénoliques :**

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des composés phytochimiques très répandus dans le règne végétal. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10 000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui, ils sont répartis dans les différentes parties de la plante; racines, tiges, fleurs, et feuilles. Les principales sources alimentaires sont les fruits et les légumes, les boissons comme le vin rouge, le thé, le café, les jus de fruits<sup>74,75</sup>.

Au cours des dernières années, les chercheurs et les fabricants de produits alimentaires se sont de plus en plus intéressés à ces composés, qui pourraient être exploités pour le développement de la chimio prévention<sup>76</sup>. en raison de leurs effets positifs sur la santé humaine, attribués principalement à leurs activités antioxydantes<sup>77</sup>. Les composés phénoliques ont de nombreuses activités biologiques ; ils peuvent agir comme :

- un antioxydants et piègeurs d' espèces réactives de l'oxygène (ROS) :
- chélateurs des métaux<sup>76</sup>

Les composés phénoliques sont des agents réducteurs capables de réagir avec les radicaux libres produits par notre organisme. Les composés phénoliques, apportés par l'alimentation, renforceraient les défenses antioxydantes de l'organisme en captant les radicaux libres et protégeraient les lipides, les protéines et l'ADN des dommages oxydatifs. Les composés phénoliques peuvent agir en tant qu'antioxydants de différentes manières<sup>77</sup>. les polyphénols possèdent la structure chimique idéale pour piéger les radicaux libres. Des essais in vitro ont démontré que les polyphénols sont plus actifs que les vitamines E et C, des antioxydants couramment utilisés<sup>78</sup>.

Il a été démontré que l'enrichissement des aliments en composés phénoliques confère des propriétés antimutagènes, anticancéreuses, antiallergique, anti-inflammatoires et antioxydantes<sup>76,78</sup>.

La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables selon les végétaux. Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants<sup>74,77</sup>. Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols(Figure 13)<sup>74</sup>

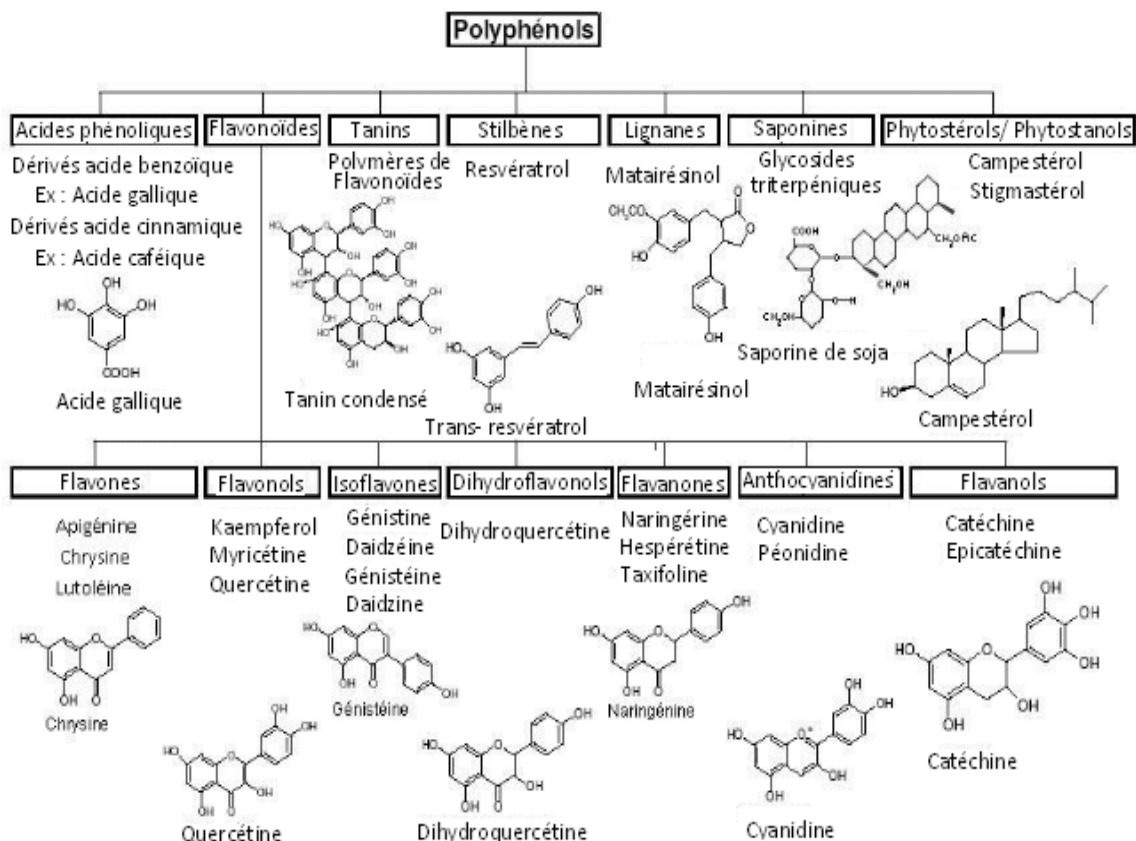


Figure 13 : Différentes classes des composés phénoliques<sup>74</sup>.

il existe plusieurs catégories de composés phénoliques<sup>74</sup>, toutefois nous allons présenter les plus abondants dans le matériel végétal étudié (fleur et bractée de *tilia cordada*) qui sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (selon le chapitre 5).

### VI-1-1-les flavonoïdes :

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus* = jaune) .

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire possédant un squelette carboné en C6-C3-C6. Ils sont constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone, formant 2 noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle (C) à oxygène (Figure 14)<sup>77,79</sup>, liés à un certain nombre de groupes hydroxyles, conférant l'activité antioxydante. Les principaux groupes des flavonoïdes sont les flavanones, les flavones et les flavonols.

Les sources alimentaires riches en flavonoïdes sont le soja (isoflavones), les agrumes (flavanones), le thé, les pommes et le cacao (flavanols), le céleri (flavones), les oignons (flavonols) et les baies (anthocyanines)<sup>80</sup>

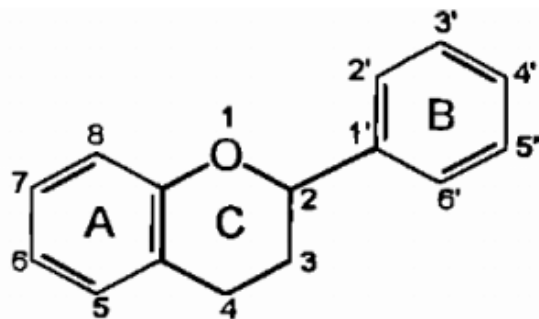


Figure 14 : Structure chimique de base des flavonoïdes<sup>79</sup>.

les flavonoïdes a un vaste spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris des propriétés antioxydantes et piégeant les radicaux libres<sup>80</sup>. donc ils sont considérés comme des agents de blocage dans la cancérogenèse selon un ou plusieurs modes d'action possibles<sup>81</sup> .

Il existe des relations spécifiques entre la structure des flavonoïdes et leurs activités anti-mutagènes pour chaque classe de mutagènes. L'effet anti-mutagène dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle phénoliques, comme on peut le voir dans les flavones.

Le blocage des groupes hydroxyle par alkylation ou acétylation diminue les activités antimutagènes<sup>80</sup> .

En outre, les structures de flavanols fournissent une caractéristique nucléophile permettant de réagir avec un mutagène électrophile pour former des adduits flavanol-mutagène qui peut prévenir l'apparition de la mutagénicité<sup>82</sup>. Les flavonoïdes inhibent également les enzymes clés impliquées dans la production de ROS, telles que la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la glutathion-S-transférase et la NADH oxydase<sup>80</sup>.

### VI-1-1-1-Quercétine :

La quercétine (3,3', 4', 5,7-pentahydroxyflavone) est un composé polyphénolique naturellement présent dans les légumes, les fruits, les noix et les boissons comme le café, le thé et le vin rouge. Sa consommation humaine moyenne se situe entre 25 et 50 mg par jour. La quercétine est connue par un large spectre d'actions pharmacologiques. Il aurait des propriétés cardioprotectrices, antivirales, antiallergéniques, anticancéreuses et antiprolifératives.

La quercétine prévenir le stress oxydatif en piégeant l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le -OH et l'oxygène singulet. Il empêche également la peroxydation lipidique et les dommages membranaires en inhibant les enzymes COX et LOX. Les fragments chimiques attribués à la propriété antioxydante de QC sont les fragments 3', 4'-dihydroxy (= catéchol), le substituant 3-hydroxyle et la double liaison C2 = C3 .

Les études de relation structure-activité (SAR) ont révélé que les hydroxylés phénoliques présents dans les flavonoïdes naturels, tels que la quercétine, l'héliosine, l'hyperoside, le kaempférol, la myricétine .. sont les principaux actifs groupes responsables de l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles . La quercétine s'est révélée être le plus actif des 31 flavonoïdes testés, avec une IC 50 de 0,93 µm dans les études SAR sur l'activité de piégeage du peroxy-nitrite.

Yang et al. Il a été démontré que la quercétine, la dihydromyricétine et le kaempférol possèdent l'activité antioxydante la plus puissante du test de Rancimat. La quercétine peut moduler le métabolisme des carcinogènes par inhibition et / ou induction des enzymes de biotransformation de phase I et II<sup>83</sup> .

Le tableau 1 résume des différentes études sur les propriétés protectrices et antigénotoxiques du quercétine dans différents modèles in vivo et in vitro. Les résultats démontrent clairement le caractère protecteur de CQ .

Tableau 6. Actions protectrices et antigénotoxiques du CQ dans différents modèles in vivo et in vitro :

Type de test	Dose	Résultat	Référence
In vivo	50 mg / kg	Prévenir le stress oxydatif dans la gastropathie hypertensive portale <sup>84</sup>	Moreira en 2004
In vivo	300 mg / kg	Prévention de la génotoxicité par l'aflatoxine B1 <sup>85</sup>	Kohli en 2002
In vivo	0,025%, 0,05%, 0,1% dans le régime alimentaire	Empêche la présence de CA et de MN dans la moelle osseuse <sup>86</sup>	Taj et Nagarajan en1996
In vitro sur les lymphocytes humains	1, 10, 50, 100 µm	Protection contre les dommages induits chimiquement à l'ADN <sup>87</sup>	Wilms en 2005

### VI-1-1-2 Kaempférol :

Le kaempférol est un flavonoïde de type flavonol, à une bonne activité anti-oxydante. la structure du kaempférol avec sa double liaison 2,3 et ses fonctions 3,5 et 7-OH avec le

groupe 4-oxo, répond aux Critères du puissant piègeur de radicaux rapporté par Edenharder et Grunhage en 2003. En effet, Edenharder et Grunhage en 2003 ont étudié le kaempférol pour ses activités mutagènes / antimutagènes. Ce composant n'a présenté aucune mutagénicité, mais un effet antimutagène modéré, lors de l'utilisation du test Ames.

Le test SOS démontre que le Kaempférol diminue fortement la mutagénicité des AFB1 et du NF. Ceci est conforme à l'activité antimutagène des flavonoïdes rapportée précédemment.

Dans ce même cadre, une autre étude réalisée par Wissem B en 2011 a démontré que le kaempférol (composés isolés des feuilles de *R. alaternus* L.) a une activité anti-oxydante et anti-radicalaire <sup>78</sup>.

### **VI-1-2-Les acides phénoliques :**

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique <sup>74</sup>.

#### **VI-1-2-1 L'acide caféique :**

L'acide caféique ou Acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-propénoïque est l'un des composés phénoliques. Il appartient à la famille des acides cinnamiques. L'acide caféique (CaA), un composant des grains de café, a été isolé du café vert par Wolfrom et ses collaborateurs et du café torréfié de Krasemann. Il n'existe probablement chez les plantes que sous forme conjuguée, par exemple l'acide chlorogénique (ChA).

Les effets de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique sur la mutagénicité ont été étudiés à l'aide du système de *Salmonella typhimurium* en utilisant des mutagènes de type amine hétérocyclique : le Trp-P-1 et le Glu-P-2. Tant l'acide caféique que l'acide chlorogénique diminuent efficacement la mutagénicité du Trp-P-1 et du Glu-P-2 de manière dose-dépendante. Tous les composés ayant une structure similaire à la CaA peuvent inhiber également l'activité mutagène de Glu-P-2. Ces résultats suggèrent que de nombreux types d'extraits de plantes contenant des composés analogues à CaA ou à ChA peuvent diminuer efficacement l'activité mutagène de certains agents mutagènes tels que les amines hétérocycliques <sup>76,88</sup>.

Des études sur l'anti\_mutagénicité des acides phenoliques ont été réalisées, les resultats ont démontrés que l'acide caféique exerce un effet protecteur contre la génotoxicité de l'acridine orange et de l'ofloxacin chez *Salmonella typhimurium* ainsi que chez *Euglena gracilis*<sup>76</sup>.

Il a été démontré que l'acide cafeique et 3 autre acides phenoliques sont d'excellents inhibiteurs de la carcinogénèse de la langue induite par le 4-NQO sans effets toxiques lorsqu'ils sont administrés au cours de la phase initiale de la cancérogénèse. Ces résultats pourraient suggérer l'utilisation possible de ces substances naturelles dans la chimioprévention du cancer de la langue en plus d'autres tissus (peau, poumon, foie et œsophage)<sup>81</sup>.

Tableau 7. Quelques effet anticancerogenes de l'acide cafeique<sup>74</sup> :

<b>Acides Hydroxycinnamique :</b>	Reduisent la metastase des cellules cancreuses grace a la regulation negative de l'expression des metalloproteinases	Hwang et ces collaborateus en 2005
acide cafeique	Puissant inhibiteur de metalloproteinase-9 et l'invasion des cellules tumorales	Jin et ces collaborateus en 2005

### VI-1-2-2- L'acide p-coumarique :

L'acide p-coumarique est un polyphénol omniprésent dans les céréales comme le maïs, l'avoine, le blé et les fruits et légumes comme les pommes, raisins, oranges, tomates, pommes de terre . Il a été démontré que l'acide p-coumarique a un effet protecteur contre plusieurs pathologies comme l'athérosclérose, la carcinogénèse et contre les dommages causés par les UV aux tissus oculaires, et contre la lésion neuronale dans la maladie de Parkinson. Par

ailleurs de nombreux travaux ont démontré que l'acide p-coumarique a un effet anti-ulcère, anti-mutagène, et des activités anti-inflammatoires <sup>75</sup>.



**Deuxième partie :**

**Partie pratique**

Notre mémoire de fin cycle est d'évaluer l'activité antimutagénique des extraits aqueux de *Tilia Cordata* à l'aide d'une test de génotoxicité qui est le test micronoyau : technique préalablement décrite de manière détaillée dans les directives de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) et dans les directives des ateliers internationaux sur les tests de génotoxicité (IWGT) qui est « Le test de micronoyaux in vivo sur les érythrocytes de mammifère ».

**I -Matériel et Méthodes :**

**I -1- Matériel :**

Tableau 8 récapitulatif de matériels .

<p><b>I -1-1- Réactifs:</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les solutions tampons de Sorensen à (pH=6.7) et (pH=6.8) :</li> <li>- Phosphate de sodium dibasique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</li> <li>- Phosphate de potassium monobasique (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</li> <li>- étalons du pH mètre : à pH=4 et pH=7</li> <li>- Colorant May Grunwald -MG- en poudre</li> <li>- Colorant Giemsa en solution mère (Giemsa lent)</li> <li>- Poudre pour préparation injectable du cyclophosphamide (CPA).</li> <li>- Ether diéthylique</li> <li>- Chloroforme</li> <li>- Eau distille</li> <li>- Ethanol absolu</li> <li>- Méthanol</li> <li>- Hypochlorite de sodium</li> <li>- Anti coagulant EDTA sous forme liquide</li> <li>- Acide chlorhydrique (HCl)</li> <li>- la soude (NaOH)</li> </ul>
<p><b>I -1-2-Substances d'essai:</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lyophilisat de l'extrait aqueux (Le matériel végétal (<i>Tilia Cordata</i>), composé</li> </ul>

	<p>de bractées et de fleurs séchées ; a été obtenu auprès d'un herboriste possédant un local au niveau de la ville de Blida.</p> <p>-Cyclophosphamide à 500 mg (FAMISAS °, laboratoire ELKENDI), poudre pour solution injectable</p>
<b>I -1-3-Instruments:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Seringues à 1ml, 5ml</li><li>- Sonde de gavage</li><li>- Tubes capillaire à hématocrite</li><li>- Tube pour prélèvement contiennent l'EDTA liquide (1/10)</li><li>- Micropipette et embouts</li><li>- Lames</li><li>- Support pour lames</li><li>- Balance analytique ET balance grossière</li><li>- Verreries</li><li>- pH mètre</li><li>- Agitateur électromagnétique</li><li>- Microscopes optiques + huile d'immersion</li><li>- Lyophilisateur CRIST <math>\alpha</math> 2-44</li><li>- Evaporateur rotatif BUCHI R-200</li><li>- Plaque chauffante</li><li>- Réfrigérateur</li><li>- Papier filtre et papier joseph</li><li>- Coton 41</li><li>- Cages et grilles</li><li>- Loupe binoculaire CARL ZEISS Jena</li><li>- Broyeur électrique à couteaux</li><li>- Lumière UV (365nm)</li><li>- Etuve à 100°C</li></ul>
	Les animaux d'expérience sont des Souris

**I -1-4-Animaux:**



de type albinos de souche SWISS, sexe féminin, issues d'élevage de l'animalerie du département de pharmacie-Constantine, et traitées selon les règles de l'éthique.

**\*\* Remarque :** Selon le Groupe d'étude du Test de Micronoyaux de la Société Japonaise des Mutagènes environnementaux (CSGMT 1986, Ashby and Mohammed), la sensibilité au CPA est similaire pour les deux sexes, ce qui explique l'utilisation des souris femelles seulement. Tous les lots utilisés ont été exposé aux mêmes conditions environnementales.

**- Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux :**

Les conditions d'élevage et d'entretien sont correctes pour les souris. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire (Les souris ont un accès libre à la nourriture à base de granulés et à l'eau potable, ils sont maintenus dans une salle à température ambiante).

Les animaux sont placés aléatoirement dans des cages standard pour une période d'acclimatation aux conditions de travail avant d'être utilisés dans notre expérimentation.

**I -2-Méthode:**

**I -2 -1 -préparation d'extrait aqueux :**

Nous avons extrait les éléments hydrophiles par la préparation d'une infusion :

- pulvérisation de 30g de matériel végétal dans un litre d'eau distillée bouillante.
- infusion pendant 8min.
- Lyophilisation du filtrat récupéré.



Figure 15 :l' Extrait aqueux de tilleul

**I -2- 2-Préparation des solutions à administrer:**

**a- Préparation de la solution injectable du cyclophosphamide:**

- On calcule la masse à peser de la poudre du CPA qui permet la préparation d'une solution à 40 mg/kg (masse CPA/masse souris) selon le poids moyen du lot.
- On calcule volume de l'eau distillée nécessaire pour préparer une quantité suffisante à administrer à raison de 0.5 ml de solution injectable/souris.

**b- Préparation de la solution de l'extrait aqueux:**

- On calcule la masse de la poudre de l'EA à peser qui permet la préparation d'une solution à 50 mg/kg (poudre de l'EA/souris) selon le poids moyen du lot.

-On Mélange la poudre avec le volume calculé de l'eau distillée. Chaque souris reçoit 0.5 ml de solution.

### **C-Solvants / véhicules:**

Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les substances chimiques d'essai. Le véhicule que nous avons utilisé est l'eau distillée :

- Solutions aqueuses du CPA (agent mutagène) pour administration en intra-péritonéale.

- Solutions aqueuses des extraits (aqueux) du tilleul pour administration par gavage.

### **I -2-3-Sélection et préparation des animaux:**

Chaque lot contenait 05 souris. Avant toute manipulation, nous avons pesé toutes les souris et calculé le poids moyen qui a été situé entre 20 –27 g. Cela permet le calcul de la dose administrée de chaque solution.

### **I -2-4-Application du test de micronoyaux dans l'évaluation de l'effet antimutagène:**

Ce test est un test de génotoxicité qui évalue l'activité mutagène des substances. Dans notre travail, nous avons l'utilisé pour étudier le potentiel antimutagène. Le principe consiste en une induction de l'effet mutagène/cancérigène par introduction d'une substance dont les effets délétères ont été démontrés à des doses convenablement choisies, accompagnée de l'exposition préalable à la substance supposée être antimutagène. L'observation des effets sur le nombre de cellules micro-nucléées apparues dans les lots test (antimutagène + mutagène), témoins positifs (mutagène : CPA) et témoins négatifs (véhicule), cela se fait en calculant un pourcentage de réduction de la fréquence des micronoyaux par deux méthodes :

**\* le pourcentage de réduction de la fréquence des MN est calculé suivant la formule :**

$$\% \text{ réduction} = \frac{\text{fqce de MN dans A} - \text{fqce de MN dans B}}{\text{fqce de MN dans A} - \text{fqce de MN dans C}} \times 100$$

Avec : A = groupe témoin positif ; traitée par la substance mutagène.

B = groupe traité par la substance mutagène et la substance teste.

C =: groupe traité par l'eau (témoin négatif) <sup>89</sup> .

**\*La diminution des taux de cellules MN (RMN) a été définie par la formule suivante :**

MN (*antimutagène+mutagène*) –MN (*témoin négatif*)

$$RMN = \frac{\text{MN (antimutagène+mutagène)} - \text{MN (témoin négatif)}}{\text{(mutagène)} - \text{MN (témoin négatif)}}$$

On considère que la substance testée est :

Fortement antimutagène si **RMN<0,75**

Faiblement antimutagène si RMN est **entre 0,75 et 0,85**,

Non antimutagène si **RMN>0,85** <sup>90</sup>.

**I -2-5-Mode opératoire:**

**a-Traitement :**

Le travail a été effectué en utilisant 3 groupes de cinq animaux (témoin négatif, témoin positif, lot test (Extrait aqueux)). Chaque lot a été traité selon des étapes systématiques qu'on va détailler :

\* **Témoin négatif:** Recevant le véhicule (l'eau distillée) pendant 05 jours.

\* **Témoin positif :** Recevant une injection intra- péritonéale d'une dose de 40 mg/Kg du CPA.

\* **Lot testé :** Recevant une solution aqueuse de l'extrait aqueux (EA) à raison 50 mg/kg de pendant 5 jours, après 2heurs de jeun par voie orale et une injection d'une solution aqueuse de CPA par voie intra-péritonéale au troisième jour.

-Tous les groupes ont été sacrifiés après une exposition de 48 heures à la cyclophosphamide.

Tableau 9 : récapitulatif de traitement appliqué




Lot	Témoin négatif	Témoin positif	test
substance	véhicule	CPA	-EA -CPA
voie	orale	Intra-péritonéale	-orale -IP
La durée de traitement (jours)	5 jours	Injection unique	-EA 5 jours -CPA au 3° jour
Dose (mg /kg)		40	-50 -40
Prélèvement	Après 3 jours	Après 48 h	Au 5 eme jour

**b.Prélèvement :**

les prélèvements a été réalisée le 5ème jour au niveau de sinus rétro-orbito-oculaires (région cartilagineuse richement vascularisée) pour toutes les souris pour obtenir du sang périphérique.

Le prélèvement était effectué comme suit:

Tableau 10 : : récapitulatif de prélèvement appliqué

<p>1- Fixation de la souris sur la grille. 2- Contention manuel de l'animal</p>	
<p>3-Anesthésie avec du coton imbibé à l'éther.</p>	
<p>4- Création une exophtalmie, pour faciliter le prélèvement. 5- Ponction au niveau de l'ongle interne de l'œil à l'aide d'un tube capillaire à hématocrite. 6- Collection du sang qui passe par capillarité dans le tube EDTA, jusqu'à obtenir un volume suffisant.</p>	



7- Mélange du contenu des tubes par retournement.



**C-.préparation des frottis:**

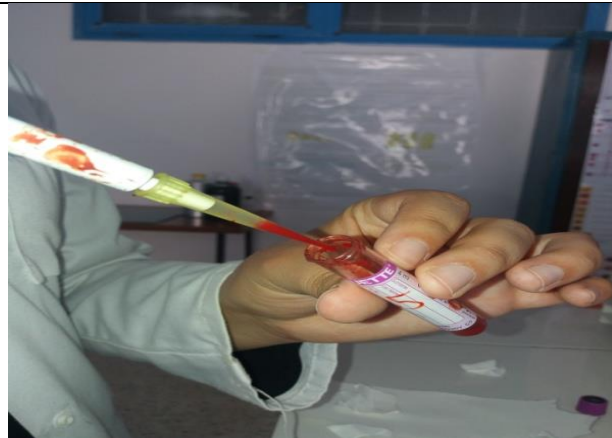
L'intérêt de réalisation des frottis est de dénombrer les NCE et les PCE y compris ceux contenant des micronoyaux.

Tableau 11 : préparation des frottis

1-préparation du poste de travail, des matériels.  
2-homogénéisation et ouverture du tube contenant le sang



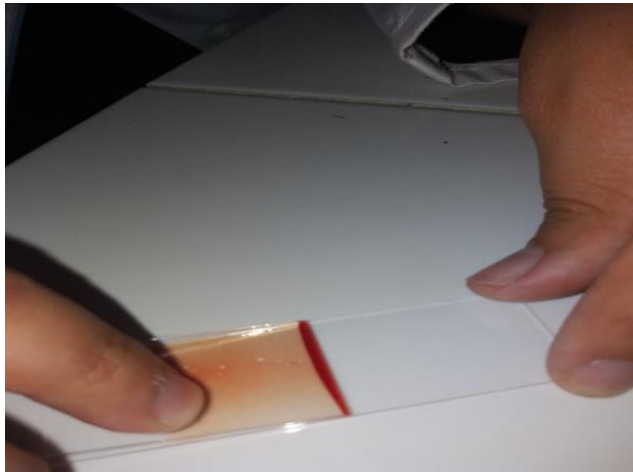
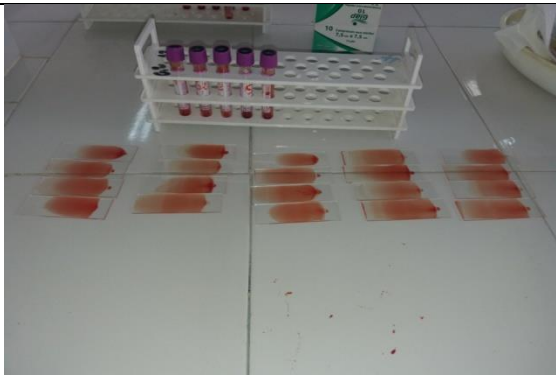

3- Prélèvement d'une petite quantité de Sang en utilisant une micropipette.



4-Dépôt d'une goutte de sang a l'extrémité D'une lame.





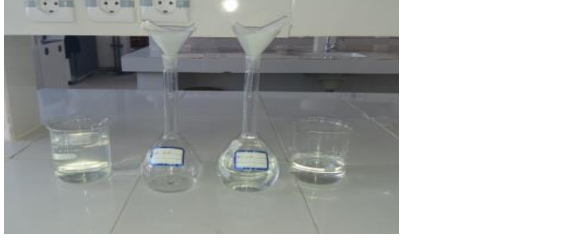


<p>5- Placement du bord d'une autre lame Sur la lame contenant la goutte du sang.</p> <p>6- glissement jusqu'à la goutte du sang , en maintenant l'angle de 45°</p> <p>7- Etalement du sang en glissant la lame d'un mouvement lent et régulier en maintenant l'angle de 45°.</p>	
<p>8--séchage du frottis.</p>	
<p>9--Sélection des frottis présentant une couche fine de sang (4 lames numérotées pour chaque souris).</p>	

**d-Coloration :**

**\*Préparation des solutions tampon de Sorensen:**

Tableau 12 : Préparation des solutions tampon de Sorensen

<p>1- peser 11.94 g de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math> et 4.54 g de <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></p> <p>2- les mélanger dans un volume de 500 ml d'eau distillée.</p> <p>3- Agiter en utilisant l'agitateur électromagnétique.</p>	 A photograph of a laboratory bench. On the left, there are two white plastic bottles with blue and red caps. To the right, a white magnetic stirrer is visible. The background shows a typical laboratory setting with white cabinets and a sink.
<p>- ajuster le pH de la solution pour obtenir 6.7</p>	 A photograph showing a digital pH meter on a white surface. The meter has a black display and buttons. To its left, a clear glass beaker contains a clear liquid. A black electrode is partially submerged in the liquid. The meter's brand name 'FAC-MED. 50555' is visible at the bottom.
<p>-Filtrer</p>	 A photograph of laboratory glassware on a white surface. There are two Erlenmeyer flasks in the center, each containing a clear liquid. To the left and right of the flasks are two small glass beakers, also containing clear liquid. The background shows a laboratory bench.

- refaire la même procédure pour obtenir une solution tampon à  $\text{pH}=6.8$

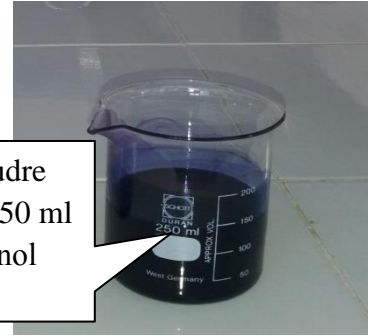
**\*Préparation des colorants :**

- May Grunwald:

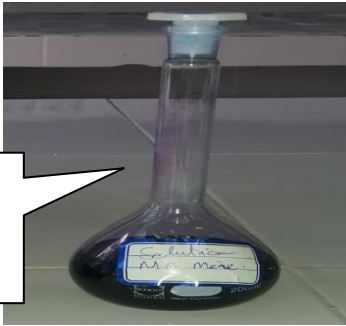
Peser 5 g de poudre de MG.



Dissoudre dans 150 ml d'éthanol absolu



-obtention de la solution MG mère



-Agiter en utilisant l'agitateur électromagnétique.  
- Filtrer à l'aide d'un papier filtre.



- Préparer une solution fille à 0.5 % en mélangeant 50 ml de la solution mère préparée avec 50 ml de la solution tampon de Sorensen à ph=6.8.



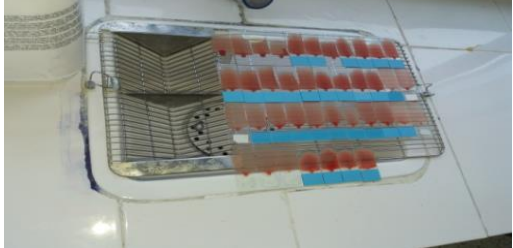

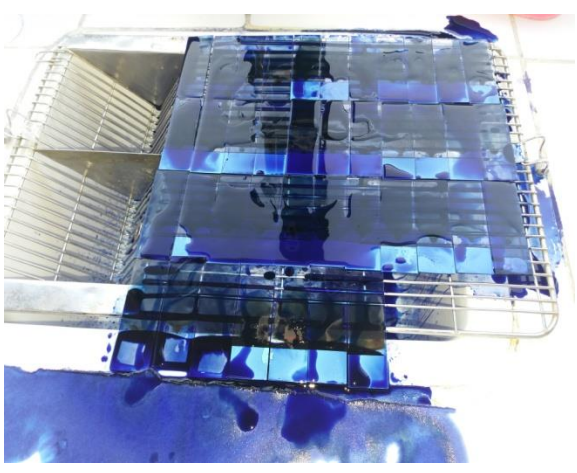
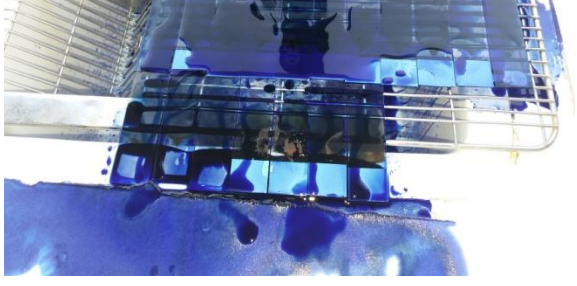
- Giemsa :

-Prendre 14 ml de Giemsa en solution et 86 ml de la solution tampon de Sorensen à ph=6.7- mélanger et filtrer



**\*Protocole de coloration :**

Tableau 13 : Protocole de coloration

<p>1-poser les lames sur le support par ordre</p>	
<p>2-Colorer selon la procédure suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-méthanol absolu : 10 min</li> <li>-MG à 1% : 1 min</li> <li>-MG à 0.5% : 1 min</li> <li>-Giemsa à 14 % : 20 min</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sorensen à pH = 6.7 : 10 s</li> <li>-Sorensen à pH = 6.8 : 10 s</li> <li>-Lavage à l'eau distillée</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sorensen à pH = 6.8 : 10 s</li> </ul>	

- Une nuit de séchage des lames à l'air



Le but de cette technique de coloration est de repérer les micronoyaux dans les frottis réalisés ainsi que différencier les PCE et NCE.

**PCE** : il synthétise activement l'hémoglobine et il apparaît bleuâtre à la coloration au MGG

**NCE** : son cytoplasme est riche en hémoglobine ce qui donne une coloration rose à la réaction au MGG

**e-Lecture sous microscope optique:**

- Ajout d'une goutte de l'huile d'immersion.
- Lecture à l'objectif 100
- Le but était le calcul de:
  - Ratio PCE/2000NCE.
  - Fréquence des MNNCE dans 2000 NCE.
  - Fréquence des MNPCE dans 2000 PCE.
- Les cellules NCE apparaissent en rose, et les cellules PCE apparaissent bleuâtres.
- Une bonne observation était nécessaire pour différencier les PCE des NCE puisque la différence de coloration était légère.

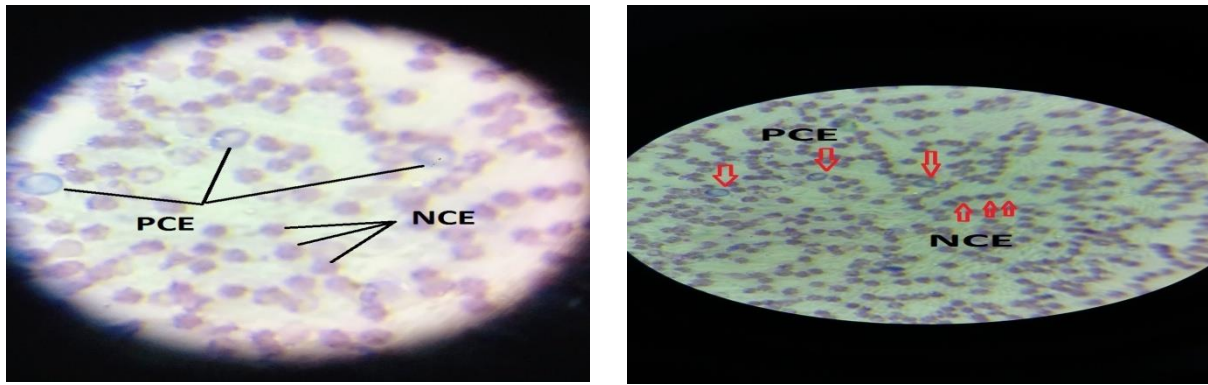


Figure 16 :démonstration des PCE (bleu) et des NCE (rose) sous microscope optique, objectif x100.

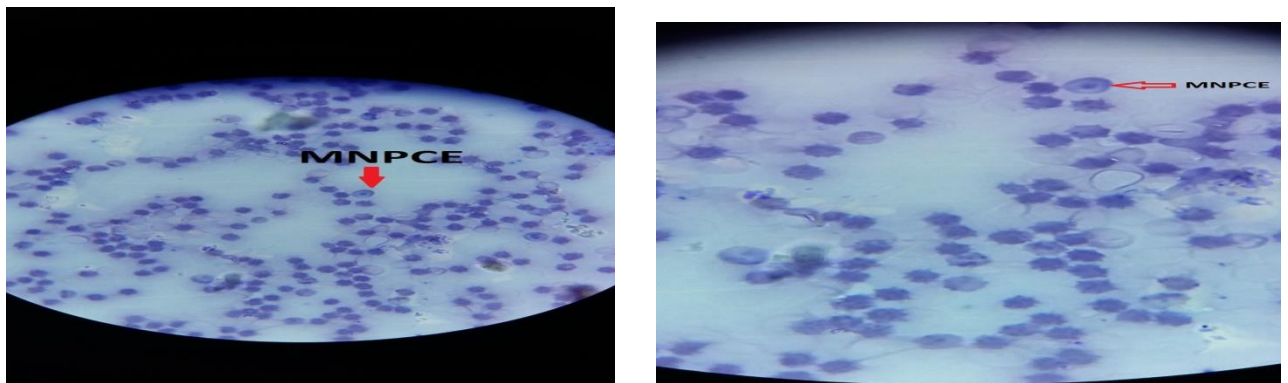


Figure 17 :démonstration de l'MNPCE sous microscope optique, objectif x100.

## II -Résultats:

### II -1-Etude antimutagénique :

Les rapports calculés au cours de la lecture sous microscope optique sont démontrés dans les tableaux suivants:



Tableau 14: Résultats du lot Témoin négatif.

		MNPCE/2000PCE	MNNCE/2000NCE	PCE/2000NCE
<b>SOURIS</b>	1	02	00	57
	2	06	01	28
	3	01	00	26
	4	01	01	49
	5	0,1	00	45
	<b>Moyenne</b>	2.2	0,4	41

Tableau 15: Résultats du lot Témoin positif

		MNPCE/2000PCE	MNNCE/2000NCE	PCE/2000NCE
<b>SOURIS</b>	1	24	02	36
	2	26	02	38
	3	23	01	40
	4	28	01	38
	5	19	00	34
	<b>Moyenne</b>	24	1.2	37.2

Tableau 16: Résultats du lot traité par l'EA de tilleul

	MNPCE/2000PCE	MNNCE/2000NCE	PCE/2000NCE	
<b>SOURIS</b>	1	10	0	16
	2	11	0	19
	3	8	0	15
	4	10	1	18
	5	7	0	13
<b>Moyenne</b>	<b>9.2</b>	<b>0,2</b>	<b>16,2</b>	

1-le pourcentage de réduction de la fréquence des MN est calculé suivant la formule :

$$\% \text{réduction} = \frac{\text{MN témoin positif} - \text{MN test}}{\text{MN témoin positif} - \text{MN témoin négatif}} * 100^{89}$$

➤  $\% \text{réduction EA} = (24 - 9.2 / 24 - 2.2) * 100$

➤  $\% \text{réduction EA} = 67.889.$

2-  $\text{RMN} = (\text{MN test} - \text{MN témoin négatif}) / (\text{MN témoin positif} - \text{MN témoin négatif})^{90}$

➤  $\text{RMN (EA)} = (9.2 - 2.2) / (24 - 2.2)$

➤  $\text{RMN (EA)} = 0.321 \longrightarrow 32.11\%$

Le résultat obtenu par l'extrait aqueux est inférieur à 0.75. Il est donc **fortement antimutagène**.

## II -2-Analyse statistique:

L'application du test student sur un intervalle de confiance 95% (en utilisant logiciel d'analyse statistique spss).



\* Vérification des conditions de l'application du test :

-la normalité (nombre d'échantillon doit être supérieure à 30 → pas compatible avec nos données )

-égalité de variances.

**II -2-1 -L'Analyse statistique de rapport MNPCE/2000PCE :**

**\*Comparaison du résultat du lot Témoin négatif et du lot Témoin positif :**

Tableau 17 : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot Témoin positif

Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
							Inférieure	Supérieure
,634	,449	-12,111	8	,000	-21,80000	1,80000	-25,95081	-17,64919
		-12,111	6,802	,000	-21,80000	1,80000	-26,08162	-17,51838

Les variances sont égales

Les moyennes ne sont pas égales

P-value = 0.449 > **0.05**

P-value = 0.000 < 0.05

**\*Comparaison du résultat du lot Témoin négatif et de Lot traité par l'EA :**

Tableau 18 : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot test. .

Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
							Inférieure	Supérieure
,058	,815	-5,754	8	,000	-7,00000	1,21655	-9,80538	-4,19462
		-5,754	7,455	,001	-7,00000	1,21655	-9,84145	-4,15855

Les variances sont égales

Les moyennes ne sont pas égales

P-value = 0.815 > **0.05**

P-value = 0.000 < 0.05

**\*Comparaison du résultat du lot Témoin positif et du Lot traité par l'EA :**

Tableau 19 : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin positif et du lot test..

Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
							Inférieure	Supérieure
1,154	,314	8,782	8	,000	14,80000	1,68523	10,91385	18,68615
		8,782	5,780	,000	14,80000	1,68523	10,63807	18,96193

Les variances sont égales

Les moyennes ne sont pas égales

P-value = 0.314 > **0.05**

P-value = 0.000 < 0.05

**II -2-2-L'Analyse statistique de rapport PCE/2000NCE :**

**\*Comparaison du résultat du lot Témoin négatif et du lot Témoin positif :**

Tableau 20 : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot Témoin positif .

Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
							Inférieure	Supérieure
16,485	,004	,620	8	,552	3,80000	6,12699	-10,32886	17,92886
		,620	4,228	,567	3,80000	6,12699	-12,85585	20,45585

Les variances ne sont pas égales

Les moyennes sont égales

P-value = 0.004 < **0.05**

P-value = 0.567 > **0.05**

**Comparaison du résultat du lot Témoin négatif et du Lot traité par l'EA**

Tableau 21 : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin négatif et du lot Test..

Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
							Inférieure	Supérieure
16,124	,004	4,042	8	,004	24,80000	6,13514	10,65233	38,94767
		4,042	4,250	,014	24,80000	6,13514	8,15354	41,44646

Les variances ne sont pas égales

Les moyennes ne sont pas égales

P-value = 0.004 < **0.05**

P-value = 0.014 < **0.05**

**Comparaison du résultat du lot Témoin positif et du Lot traité par l'EA :**

Tableau 22 : Comparaison statistique du résultat du lot Témoin positif et du lot test.

Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
							Inférieure	Supérieure
,011	,917	14,223	8	,000	21,00000	1,47648	17,59523	24,40477
		14,223	7,983	,000	21,00000	1,47648	17,59398	24,40602

Les variances sont égales

Les moyennes ne sont pas égales

P-value = 0.917 > **0.05**

P-value = 0.000 < **0.05**

L'effet de l'extrait aqueux de tilleul sur la fréquence des MNPCE dans le sang périphérique, 48h après le traitement par CPA, est présenté dans le tableau 3. Le lot test a été traité avec l'EA à une dose de 50mg / kg. Pendant 4 jours.

La fréquence des MNPCE a été augmentée dans le groupe de souris traitée par CPA seule (témoin positive) par rapport au groupe témoin négative. CPA est significativement augmenté la fréquence des MNPCE ( $p < 0.05$ ). Chez les souris traitées avec l'EA de *Tilia cordata* et la CPA, le nombre de MNPCE avait diminué par rapport à celles traitées avec la CPA seule ainsi que par rapport au témoin négative. L'EA est significativement réduit la fréquence des MNPCE induites par le traitement par CPA ( $p < 0,05$ ). Les données ont montré que l'EA de tilleul devrait avoir une action suppressive sur les effets clastogènes induits par le cyclophosphamide. par conséquent, on peut dire que cette extrait a un effet antimutagène.

La détermination du rapport PCE / 2000 NCE chez les souris traitées par l'EA de tilleul a montré un effet cytotoxique prononcé de la Tilleul sur la prolifération de la moelle osseuse, L'EA est significativement réduit le rapport PCE/200NCE ( $p < 0,05$ ). mais ce rapport a été réduit légèrement de manière non significative dans la moelle osseuse de la souris après le traitement à la PCA ( $> 0.05$ )

Cette résultat a montré que l'administration de tilleul induisait des effets myélossupresseur. Par la diminution de prolifération d'éléments myéloïdes immatures des souris .

### **III -Discussion :**

Les résultats montrent la validité d'utilisation d'un test toxicologique qui est le test des micronoyaux chez les mammifères dans l'évaluation de l'activité antimutagénique (forme revers).l'évaluation de cette activité est justifiée par la diminution statistiquement significative des taux des hématies micronucléées , comme modèle de lésion chromosomique, dans le sang périphérique après l'exposition des souris à un agent connue mutagène qui est le cyclophosphamide ainsi que l' extraits aqueux de *Tilia cordata*.

cette étude a démontré que l'EA de tilleul présentait des effets chimioprotecteurs puissants contre la génotoxicité induite par le cyclophosphamide dans les hématies des souris. Le résultat obtenus est inférieur à 0.75, Il est donc fortement antimutagène <sup>90</sup>.

Le cyclophosphamide est un agent alkylant, est un médicament largement utilisé en clinique pour traiter les tumeurs malignes et non malignes . Cependant, malgré son large spectre d'utilisations cliniques, il présente une cytotoxicité sévère vis-à-vis des cellules normales tant chez l'homme que chez l'animal expérimental <sup>91</sup>. Il s'agit d'un composé génotoxique de référence largement utilisé et bien documenté <sup>92</sup>. Ses métabolites peuvent interagir avec les macromolécules cellulaires telles que les protéines, les lipides membranaires, l'ARN ainsi que l'ADN et induire l'apoptose <sup>93</sup>. Un de ses métabolites, à savoir l'acroléine, induit un stress oxydatif qui endommage l'ADN des cellules normales et provoque des toxicités pour divers organes. Le compartiment hématopoïétique de la moelle osseuse est l'un des sites les plus touchés <sup>94,95</sup>.

Le radical hydroxyle est hautement réactif et il est considéré comme le plus important en termes de conséquences biologiques et est considéré comme l'espèce ultime responsable des dommages à l'ADN<sup>96</sup>. le radical libre dans le stress oxydatif initie une chaîne de réaction dans le corps qui endommage finalement les composants cellulaires. Les dommages causés à la structure de la protéine entraînent la formation de mauvais acides aminés, tandis que les dommages causés aux lipides entraînent une peroxydation lipidique. Cependant, les dommages au noyau contribuent à un effet plus grave sous forme de mutations. Il est bien établi que la conséquence des mutations conduit à une cancérogenèse <sup>97</sup>. En effet ,il a été rapporté que plusieurs métabolites de CPA ont un groupe OH fonctionne <sup>96,98</sup>.En

conséquence, la possibilité que l'EA de Tilleul offre une certaine protection contre les effets génotoxiques et cytotoxiques de la CPA, démontrée dans la présente étude, peut être influencée par sa capacité de piégeage radicalaire<sup>77,99</sup>. en outre que Le cyclophosphamide et ses métabolites peuvent se lier à l'ADN, causant des dommages pouvant entraîner des bris de chromosomes, la formation de micronoyaux et la mort cellulaire<sup>96</sup>.

L'administration de l'extrait aqueux de tilleul pendant quatre jours à la dose de 50 mg/kg a réduit la fréquence de la MNPCE induite par la CP près de 2,7 fois. La littérature disponible suggère que ces métabolites secondaire de cette plante, à savoir les composé phénoliques, sont les responsables de cette activité<sup>77</sup>.

Les composés phytochimique naturels de tilleul (détaillé dans le chapitre 5), y compris les flavonoïdes, peuvent jouer un rôle dans le piégeage des radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles générés par des agents chimiques dangereux<sup>100</sup>. Au cours des dernières années, les chercheurs et les fabricants de produits alimentaires se sont de plus en plus intéressés à ces composés naturels, qui pourraient être exploités pour le développement de la chimio prévention. en raison de leurs effets positifs sur la santé humaine, attribués principalement à leurs activités antioxydantes<sup>76,78</sup>. L'augmentation du ROS (espèces réactives de l'oxygène) au niveau intracellulaire, souvent appelée stress oxydatif, représente une agression potentiellement toxique, qui interagit avec les macromolécules pour induire un dysfonctionnement de la membrane cellulaire, une peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN<sup>100</sup>. les polyphénols possèdent la structure chimique idéale pour piéger ces radicaux libres. Des essais in vitro ont démontré que les polyphénols sont plus actifs que les vitamines E et C, des antioxydants couramment utilisés. Il a été démontré que l'enrichissement des aliments en composés phénoliques confère des propriétés antimutagènes et anticancéreuses<sup>76,78</sup>. Une autre étude réalisé in vitro par Wilms en 2005 sur les lymphocytes humains, a été démontré que la quercétine protéger l'ADN contre les dommages induits par des agents chimiques<sup>87</sup>. Edenharder et Grunhage en 2003 ont également étudié le kaempférol pour ses activités mutagènes / antimutagènes. Ce composant n'a présenté aucune mutagénicité, mais un effet antimutagène modéré, lors de l'utilisation du test d'Ames<sup>78</sup>. En plus, il y a des études sur l'antimutagénicité des acides phénoliques ont été réalisées, les résultats ont démontrés que l'acide caféique exerce un effet protecteur contre la génotoxicité de l'acridine orange et de l'ofloxacin chez *Salmonella typhimurium* ainsi que chez *Euglena gracilis*<sup>101</sup>. En plus 15 études actuelles suggèrent que les acides phénoliques et les flavonoïdes pourraient avoir le potentiel d'agents chimiopréventifs contre le développement de tumeurs

du côlon. Un corpus substantiel de preuves soutient la théorie des propriétés anticancéreuses des acides phénoliques et, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris, ils peuvent inclure le piégeage des radicaux libres, l'induction d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, la régulation de l'expression génique, la modulation de voies de signalisation cellulaires, y compris celles impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'invasion<sup>101</sup>. Mais la plupart des éléments distinctifs contenus dans les plantes médicinales et les plantes consommables présentent un effet protecteur de l'ADN, soit parce qu'ils aident à éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou empêchent leur formation<sup>102</sup>. En outre, plusieurs études ont été menées concernant l'activité antioxydante du tilleul<sup>99</sup>, ainsi que des recherches menées sur certaines plantes telles que *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Valeriana officinalis*, etc. ont révélé que ces herbes inhibaient les dommages nucléaires dus à leur effet antioxydant<sup>103</sup>. Ces propriétés du tilleul sont liées à une variété de composés phytochimiques actifs, à savoir les composés phénoliques déterminés dans les fleurs de tilleul incluent les flavonoïdes, principalement les glycosides de quercétine (rutine, quercitrine et isoquercitrine), les glycosides de kaempférol et les acides phénoliques (acides caféique, p-coumarique et chlorogénique)<sup>99</sup>.

Dans cette étude, nous avons traité des souris avec notre plante (tilleul) sous forme d'extrait aqueux (infusion), en raison de sa facilité de préparation. En plus selon un travail précédent les calculs fondés sur la formule de Gebhart ont montré que les deux extraits de tilleul (aqueux et hydro-alcoolique) soient classés comme fortement antimutagène. mais cette activité se révèle plus forte dans l'extrait aqueux que dans l'extrait hydro-alcoolique<sup>104</sup>.

Six infusions à base de plantes utilisées dans le monde (*Matricaria chamomilla*, *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Uncaria tomentosa* et *Valeriana officinalis*) ont été testées pour leur effet antigénotoxique à l'aide du test de mutation somatique et de recombinaison (SMART) chez *Drosophila melanogaster*. Le peroxyde d'hydrogène a été utilisé comme génotoxique oxydant pour tester le pouvoir anti-génotoxique des perfusions médicamenteuses. Aucune de ces perfusions n'a montré une génotoxicité significative, bien au contraire, elles ont pu se comporter en tant que desmutagènes, en détoxifiant le peroxyde d'hydrogène mutagène. La teneur en composés phénoliques de telles infusions à base de plantes est considérée comme l'éliminant possible des radicaux oxygène réactifs produits par le peroxyde d'hydrogène<sup>105</sup>.

Les fleurs séchées de tilleul ont été largement consommées en tisane dans les pays européens. En Allemagne, la fleur de tilleul est un produit officiel de la pharmacopée

allemande, approuvé dans les monographies de la Commission E. En plus de nombreuses personnes sont conscientes des connaissances accrues sur les effets bénéfiques des infusions ( tisane ) sur la santé, les recherches actuelles portent principalement sur l'identification d'un large éventail de bioactifs présents dans différents types d'herbes qui pourraient être responsables de ces effets sur la santé<sup>99</sup>.

L'effet antimutagène exercé par l'extrait aqueux de tilleul suggère que celui ci pourrait être un agent potentiel pour réduire les dommages nucléaires induits par les facteurs environnementaux ou professionnelles ,il y a des gens plus exposé aux ces facteurs par exemple les radiologues , les fumeurs ...ect .des études montre que les fumeurs présentent fréquemment des taux élevés de MN dans les lymphocytes par rapport aux non fumeurs<sup>100</sup>. En outre, Erikel a été démontré en 2019 qu'il existait une corrélation significative entre l'augmentation de la fréquence de MN dans les lymphocytes périphériques humains et l'incidence du cancer<sup>106</sup>. Des études antérieures suggèrent que les composés possédant l'activité de piégeage contre les radicaux libres préviennent les dommages nucléaires<sup>107</sup>. Donc la capacité de notre extrait à prévenir les dommages nucléaires causés par le mutagène connus pourrait jouer un rôle important dans l'élimination des défauts liés aux mutations causés par les facteurs environnementaux et professionnelles .

Il faut noter que l'utilisation des doses de 100 et 25 mg / kg de l'EA de tilleul lors du travail précédent , ont donné respectivement un taux de réduction de la fréquence des MN de 71% et 73.68% <sup>108</sup> .ainsi que l'utilisation d'une dose de 400 mg / kg a donné un taux de réduction de 92.66% <sup>104</sup> alors que le résultat de notre étude à une dose de 50 mg / kg a donné un taux de réduction de 67.88%. on peut interpréter ces résultat à partir de plusieurs hypothèses :

-La diminution de effet entre 50 mg/kg et les doses 100 mg/kg et 400 mg/kg est prévisible à cause de la diminution de la teneur en substances antimutagènes .

-Mais la diminution de l'effet de réduction de la fréquence des MN à la dose 50 mg/kg est inférieur à l'effet de la dose 25 mg/kg. Ce résultat contradictoire n'est pas expliqué, mais cela pourrait indiquer que l'effet antimutagène observé à ces doses serait la somme d'effet antimutagène et mutagène des substances présentes dans l'extrait aqueux de tilleul , notamment celui de la quercetine , connue pour son effet mutagène<sup>109</sup>,qui change de manière non proportionnelle avec le changement de la concentration d'EA . Il est très difficile de spéculer sur les composés qui sont responsables de la réponse mutagène détectée

dans les extraits de plantes, car ce sont des mélanges complexes de composés organiques. La littérature suggère que la présence de composants phytophénoliques, notamment les tanins, la catéchine, les flavonones et les isoflavones, est responsable des effets génotoxiques possibles des extraits de plantes. La génotoxicité pourrait être liée à la formation de peroxyde d'hydrogène résultant de l'auto-oxydation de molécules phénoliques<sup>100</sup>. Donc la détection et l'identification des mutagènes naturels et des anti-mutagènes sont importantes car les interactions entre les composés bioactifs sont compliquées et omniprésentes<sup>100</sup>. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux caractériser l'activité antimutagène de tilleul et d'identifier leurs composés actifs et leur mode d'action. Mais nos résultats suggèrent fortement que dans certaines circonstances, cette plante présente des activités antimutagènes pouvant contribuer à un effet anticancérogène.

-la stabilité de l'effet entre les doses 100mg/kg et 25 mg/kg serait due à une diminution de l'effet mutagène par paliers.

Notre étude a démontré que l'EA de tilleul a réduit la fréquence de la MNPCE mais il est diminué la prolifération cellulaire de la moelle osseuse (entraîné une diminution significative de l'activité mitotique des cellules de la moelle osseuse ??). Cette administration a diminué le ratio PCE / 2000 NCE en pourcentage, ce rapport donne un index direct de la division cellulaire qui maintenue chez les souris traitées par le cyclophosphamide seule (témoin positive) ceci contredit certaines recherches selon lesquelles ce traitement à la cyclophosphamide a entraîné une diminution significative du nombre de cellules de la moelle osseuse et de la rate. Mais sur la base de ce résultat, on peut supposer qu'il y a un effet myélosuppresseur à une dose de 50 mg/kg d'EA.

Il faut noter que l'utilisation des doses de 100 et 25 mg / kg de l'EA de tilleul lors du travail précédent, ont donné respectivement un nombre de 27.4 PCE / 2000 NCE et 50.6 PCE / 2000 NCE<sup>108</sup>. Alors que le résultat de notre étude à une dose de 50 mg / kg a donné un nombre de 16.2 PCE/2000NCE, bien que le nombre attribué au témoin négative est 41 PCE /2000NCE. Selon cette comparaison, notre résultat correspond au résultat de la dose 100 mg/kg et est incompatible avec le résultat de 25 mg/kg. Ce dernier donne un effet positif sur la prolifération de cellules de la moelle osseuses.

Le mécanisme moléculaire exact de cet effet de l'EA n'est pas clair. Il y a toujours des problèmes dans la relation qui déterminent la dose et l'effet bénéfique. Donc d'autres essais cliniques sont également nécessaires pour mieux caractériser la relation dose / effet bénéfique pour cet extrait (tisane), ce qui garantirait l'ingestion de doses efficaces<sup>99</sup>





# **Conclusion et perspectives**

Un grand nombre d'espèces de plantes sont une grande source de composés biologiquement actifs dont l'effet sur la santé humaine ou le matériel génétique est pratiquement inconnue.

L'utilisation d'infusions de plantes pour guérir de nombreux types de maladies différentes est très commun dans la médecine populaire. Ils remplacent souvent des médicaments modernes. Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt dans les enquêtes sur les composés issus de plantes et ses avantages et inconvénients, pour s'assurer de l'absence de risque de leur utilisation..

Il existe de nombreux tests qui permettent d'évaluer la mutagénicité des substances chimiques y compris le test de Micronoyau, Ce dernier est utilisé dans le monde entier pour déterminer le potentiel mutagène ainsi que le potentiel antimutagène.

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

- Nos résultats ont montré que:
  - ❖ la plante possède une activité antimutagène intéressante, La diminution des taux de cellules MN dont le RMN de l'extrait aqueux est inférieur à 0.75. Il est donc fortement antimutagène.
- En perspective :
  - ❖ des investigations plus avancées doivent être menées pour déterminer la nature des fractions chimiques impliquées dans cette activité est établir de manière certaine l'intérêt de l'extrait de tilleul dans le traitement de tumeurs cancéreuses.
  - ❖ Il serait aussi intéressant d'évaluer la génotoxicité des extraits de plante avec d'autres tests complémentaires de génotoxicités.
  - ❖ D'autres essais cliniques sont également nécessaires pour mieux caractériser la relation dose / effet bénéfique pour cette extrait, ce qui garantirait l'ingestion de doses efficaces.

### Bibliographie:

- 1-Botta, A. (2006). Interrelations entre génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 67(2), 295-297.
- 2:Benhacine, L., Sahil, N. (2013). Etude de la génotoxicité des extraits de *Pistacia lentiscus* par le test d'Ames (Mémoire de master Bejaia).
- 3- Botta, A. (2013). relations entre génotoxicité, mutagenèse et cancerogenese.  *Journées nationales de santé au travail*, (p. 13).
- 4- Botta, A. V. (2007). *toxicologie*. paris: lavoisier.
- 5- Sanlaville, D., & Turleau, C. (2010). Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques.  *Université Médicale virtuelle francophone, Collège Nationale des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, France, 2011*, 6-7.
- 6- Baaziz, F., Bouhssane, S. (2013). Activités antiproliférative, génotoxique et antigénotoxique des extraits de deux plantes médicinales sur le cycle cellulaire de *Allium cepa*, (Mémoire de Master Bejaia).
- 7- Warrick, E. (2012). Effets des uv sur l'adn: lesions et mutations.
- 8.- Lenglet, G. (2010). *Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines* (Doctoral dissertation).
9. Fallet, E., & Jauzein, F. Les dommages à l'ADN et leur réparation.
10. Weng, M. S., Chang, J. H., Hung, W. Y., Yang, Y. C., & Chien, M. H. (2018). The interplay of reactive oxygen species and the epidermal growth factor receptor in tumor progression and drug resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 61.
- 11- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- 12- Noll, D. M., Mason, T. M., & Miller, P. S. (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical reviews*, 106(2), 277-301.
- 13- Dupont, J.-Y. (2001). *biotic genetic mutation*. Récupéré sur acces.ens-lyon.

- 14- Tubiana, M. (2008). Généralités sur la cancérogenèse. *Comptes rendus biologies*, 331(2), 114-125.
- 15 : Mongaret, C. (2012). *Etude du rôle de la protéine ADAM9 et de son isoforme sécrétée dans les processus de migration et d'angiogenèse tumoraux* (Doctoral dissertation, Paris 5).
- 16 -Mannini, L., Menga, S., & Musio, A. (2010). The expanding universe of cohesin functions: a new genome stability caretaker involved in human disease and cancer. *Human mutation*, 31(6), 623-630.
- 17 : Li, D., Hu, F., Wang, F., Cui, B., Dong, X., Zhang, W., ... & Zhao, Y. (2013). Prevalence of pathological germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in colorectal cancer. *PLoS one*, 8(3), e51240
- 18- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
19. Le Curieux, F., Giller, S., Marzini, D., Brice, A., & Erb, F. (1996). Utilisation de trois tests de génotoxicité pour l'étude de l'activité génotoxique de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 9(1), 75-95.
- 20- . Iarmarcovai, G. (2008). Mutagenèse et cancérogenèse. *Sens Public*.
21. Le Curieux, F., Giller, S., Marzin, D., & Brice, A. (1996). F. Erb (1996) Use of Three Genotoxicity Tests to Evaluate the Genotoxic Activity of Organohalides, Chlorinated Fulvic Acids and Unconcentrated Water Samples Collected from a Drinking Water Treatment Plant. *Rev. Sci. Eau*, 9(1), 75-95.
22. Pham, T. C. V. (2011). Évaluation de la fréquence des micronoyaux et du potentiel clastogène et/ou aneugène du benzo-a-pyrène suite à une exposition in vitro des lymphocytes humains.
23. Michel, C. (2011). *Biomarqueurs de génotoxicité chez Dreissena polymorpha: indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN* (Doctoral dissertation).
- 24-Quesnot, N. (2015). *Évaluation de la génotoxicité des contaminants environnementaux, production de lignées bio-senseurs et mesure de l'activité enzymatique du cytochrome P450 2E1 dans les cellules d'hépatome humain HepaRG* (Doctoral dissertation)
25. LDn°474 de l'OCDE : essai de micronoyaux sur érythrocytes de mammifères.
26. LDn°487 de l'OCDE : test des micronoyaux in vitro sur cellules de mammifères.
27. Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., & Heddle, J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A

- report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 239(1), 29-80.
28. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)(CSGMT/JEMS. MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). (1995). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS. MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10(3), 153-159.
29. Pedrazzani, R., Ceretti, E., Zerbini, I., Casale, R., Gozio, E., Bertanza, G., ... & Feretti, D. (2012). Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: integrated experimental evaluations. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 274-281.
- 30.- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of applied genetics*, 55(2), 273-285.
31. Thériault, M. (2004). *Étude des propriétés antioxydantes et antimutagènes de composés phénoliques issus de l'érable*(Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
32. Quequet, L. (1989). *L'antimutagenicité: à propos de substances naturelles* (Doctoral dissertation).
33. KADA ,T. ,INDUE ,T. ,NAMIKI, M.(1982). Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology.
- 34- Kada, T., Inoue, T., Ohta, T., & Shirasu, Y. (1986). Antimutagens and their modes of action. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms* (pp. 181-196). Springer, Boston, MA
- 35- Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E., Pages, N., Kogan, G., & Chamorro, C. Etude de L'antigenotoxicite de diferentes substances pour reduire la toxicite de L'aflatoxine B1 chez la souris. *Toxines et chercheurs biomédicales*, 123-132.
- 36- Shankel, D. M., Hartman, P. E., Kada, T., Hollaender, A., Wilson, C. M., & Kuny, G. (2013). *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms* (Vol. 39). Springer Science & Business Media.
- 37- Cozzi, R., Nicolai, M., Perticone, P., De Salvia, R., & Spuntarelli, F. (1993). Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 299(1), 37-44.
38. Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617), 1256-1264.

- 39.- . Wattenberg, L. W. (1979). Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis (Doctoral dissertation)
- 40 :- Kada, T., Inoue, T., Morita, K., & Namiki, M. (1986). Dietary desmutagens.
- 41- Sari-Minodier, I., Orsière, T., Nikoyan, A., De Méo, M., & Botta, A. (2005). Applications de la biosurveillance. *Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales*, 28, 29-33.
- 42- Norppa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 309-334.
43. Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., ... & de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74-82.
- 44- Kirsch-Volders, M., De Boeck, M., & Lison, D. (2002). Génotoxicité et activité professionnelle. *Encyl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Toxicologie-Pathologie professionnelle*, 16-537.
- 45- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084.
- 46-Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., ... & Sutou, S. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(3), 293-304.
- 47- Mattiuzzo, M., Fiore, M., Ricordy, R., & Degrassi, F. (2006). Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides. *Carcinogenesis*, 27(12), 2511-2518
- 48- Viau, C. (2008). Interprétation des résultats de surveillance biologique. *Département santé*.
- 49- Atoyebi, S. M., Oyeyemi, I. T., Dauda, B. A., & Bakare, A. A. (2015). Genotoxicity and anti-genotoxicity of aqueous extracts of herbal recipes containing *Luffa cylindrica* (L), *Nymphaea lotus* (L) and *Spondias mombin* (L) using the *Allium cepa* (L) assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(15), 492-499.

- 50- Batista, Â. G., Ferrari, A. S., da Cunha, D. C., da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Correa, L. C., ... & Júnior, M. R. M. (2016). Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food chemistry*, 197, 1153-1159.
- 51- Alvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., Dorado, V., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2001). Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 171-178.
- 52- Ribeiro, J. C., Antunes, L. M. G., Aissa, A. F., Darin, J. D. A. C., De Rosso, V. V., Mercadante, A. Z., & Bianchi, M. D. L. P. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695(1-2), 22-28.
- 53- MOHAMMEDI, Z. (2013). *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie* (Doctoral dissertation).
- 54- [Au Jardin Info.](http://www.aujardin.info/plantes/famille-tiliaceae.php) (Vendredi 30 août ). Famille des Tiliacées . Consulté le 2 Juin 2019 à [www.aujardin.info/plantes/famille-tiliaceae.php](http://www.aujardin.info/plantes/famille-tiliaceae.php).
- 55- Hurtel, D.-M. (2011) .TILLEUL ,TILIA CORDATA,TILIA PLATYPHYLLOS,TILIA VULGARIS,TILIA AMERICANA . Consulté le 4 Juin 2019 à <https://www.phytomania.com/tilleul.htm>.
- 56- Caron, M. (s.d.). *Tilleul à petites feuilles : Futura-Sciences*. Consulté le 10 JUIN 2019 à <https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/botanique-tilleul-petites-feuilles-8369/>.
- 57- Rivers, M.C., Barstow, M. & Khela, S.( 2017). Small-leaved Lime, *tilia cordata* .Consulté le 30 aout 2019. à [www.iucnredlist.org/species/203360/68079373](http://www.iucnredlist.org/species/203360/68079373).
- 58- [USDA PLANTS](http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=TILIA&display=31). Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Tilia* L. Consulté le 30 Juin 2019 à [plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=TILIA&display=31](http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=TILIA&display=31) .



- 59- Lobo, A., Hansen, O. K., Hansen, J. K., Erichsen, E. O., Jacobsen, B., & Kjær, E. D. (2018). Local adaptation through genetic differentiation in highly fragmented *Tilia cordata* populations. *Ecology and evolution*, 8(12), 5968-5976.
- 60- Kosakowska, O. K., Bączek, K., Przybył, J. L., Ejdyś, M., Kuźma, P., Obiedziński, M., & Węglarz, Z. (2015). Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products*, 78, 58-65.
- 62- ECF .[tilleul à feuilles en coeur ,Tilia corda](https://quelle-est-cette-fleur.com/Fiches-botaniques/Fiche-espece-tilleul-p-feuilles.php) . Consulté le 15 Juin 2019 à <https://quelle-est-cette-fleur.com/Fiches-botaniques/Fiche-espece-tilleul-p-feuilles.php>
- 63- Taverniers, P. (2017). Le tilleul à petites feuilles, une essence providentielle face aux changements climatiques?.
- 64- Caron ,M. Définition , tilleul à petites feuilles ,tilia cordata ,tilleul à feuilles en cœur.
- 65- Wissam, Z., Al Asaad Nour, J. B., Zein, N., & Saleh, D. (2017). Extracting and studying the antioxidant capacity of polyphenols in dry linden leaves (*Tilia cordata*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(3), 258-262.
- 66- Kosakowska, O. K., Bączek, K., Przybył, J. L., Ejdyś, M., Kuźma, P., Obiedziński, M., & Węglarz, Z. (2015). Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products*, 78, 58-65.
- 67- Bauer, B. A. (2000, August). Herbal therapy: what a clinician needs to know to counsel patients effectively. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 75, No. 8, pp. 835-841). Elsevier.
- 68- Fitsiou, L., Tzakou, O., Hancianu, M., & Poiata, A. (2007). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller oils. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2), 183-185.
- 69- Kosakowska, O. K., Bączek, K., Przybył, J. L., Ejdyś, M., Kuźma, P., Obiedziński, M., & Węglarz, Z. (2015). Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products*, 78, 58-65.
- 70- Czerwińska, M. E., Dudek, M. K., Pawłowska, K. A., Pruś, A., Ziaja, M., & Granica, S. (2018). The influence of procyanidins isolated from small-leaved lime flowers (*Tilia cordata* Mill.) on human neutrophils. *Fitoterapia*, 127, 115-122.
71. Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales* (No. 581.634 B7).

- 72- Cittan, M., Altuntaş, E., & Çelik, A. (2018). Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method. *Industrial crops and products*, 122, 553-558.
- 73- Thériault, M. (2004). *Étude des propriétés antioxydantes et antimutagènes de composés phénoliques issus de l'érable* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique)
- 74- Hmid, I. (2013). *Contribution a la valorisation alimentaire de la Grenade Marocaine (Punica Granatum L.): caracterisation physicochimique, biochimique et stabilite de leur jus frais* (Doctoral dissertation).
- 75- NANI, A. (2017). *Effets des polyphénols de mil sur le cancer de l'os et son mode d'action sur le système immunitaire* (Doctoral dissertation).
- 76- Malesev, D., & Kuntic, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *JOURNAL-SERBIAN CHEMICAL SOCIETY*, 72(10), 921.
- 78- Bhourri, W., Sghaier, M. B., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M. G., Ghedira, K., & Ghedira, L. C. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamminoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamminoside. *Food and chemical toxicology*, 49(5), 1167-1173.
- 79- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33(1), 2-16.
- 80- Rocha-Guzmán, N. E., Herzog, A., González-Laredo, R. F., Ibarra-Pérez, F. J., Zambrano-Galván, G., & Gallegos-Infante, J. A. (2007). Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*, 103(2), 521-527.
- 81- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., & Mori, H. (1993). Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*, 14(7), 1321-1325.

- 82- Tsai, Y. L., Chiou, S. Y., Chan, K. C., Sung, J. M., & Lin, S. D. (2012). Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *LWT-Food Science and Technology*, *46*(1), 169-176.
- 83- Gupta, C., Vikram, A., Tripathi, D. N., Ramarao, P., & Jena, G. B. (2010). Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *24*(1), 119-128
- 84- Moreira, A. J., Fraga, C., Alonso, M., Collado, P. S., Zettler, C., Marroni, C., ... & González-Gallego, J. (2004). Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical pharmacology*, *68*(10), 1939-1946
- 85- Kohli, E., Raj, H. G., Kumari, R., Rohil, V., Kaushik, N. K., Prasad, A. K., & Parmar, V. S. (2002). Comparison of the prevention of aflatoxin B1-induced genotoxicity by quercetin and quercetin pentaacetate. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *12*(18), 2579-2582.
- 86- Taj, S., & Nagarajan, B. (1996). Inhibition by quercetin and luteolin of chromosomal alterations induced by salted, deep-fried fish and mutton in rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *369*(1-2), 97-106
- 87- Wilms, L. C., Hollman, P. C., Boots, A. W., & Kleinjans, J. C. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *582*(1-2), 155-162
88. Yamada, J., & Tomita, Y. (1996). Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *60*(2), 328-329.
89. Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F., & Brockman, H. E. (1990). Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, *238*(1), 57-85
90. Amara-Mokrane, Y. A., Lehucher-Michel, M. P., Balansard, G., Duménil, G., & Botta, A. (1996). Protective effects of  $\alpha$ -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, *11*(2), 161-167.
- 91- Fraiser, L. H., Kanekal, S., & Kehrer, J. P. (1991). Cyclophosphamide toxicity. *Drugs*, *42*(5), 781-795.

- 92- Ahmadi, A., Hosseinimehr, S. J., Naghshvar, F., Hajir, E., & Ghahremani, M. (2008). Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Archives of pharmacal research*, 31(6), 794-797.
- 93- De Salvia, R., Fiore, M., Aglitti, T., Festa, F., Ricordy, R., & Cozzi, R. (1999). Inhibitory action of melatonin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-and cyclophosphamide-induced DNA damage. *Mutagenesis*, 14(1), 107-112.
- 94- Hoagland, H. C. (1982, March). Hematologic complications of cancer chemotherapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 9, No. 1, pp. 95-102).
- 95- Patra, K., Bose, S., Sarkar, S., Rakshit, J., Jana, S., Mukherjee, A., ... & Bhattacharjee, S. (2012). Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. *Chemico-biological interactions*, 195(3), 231-239.
96. Tohamy, A. A., El-Ghor, A. A., El-Nahas, S. M., & Noshay, M. M. (2003).  $\beta$ -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 541(1-2), 45-53.
- 97- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- 98- Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., ... & Sutou, S. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(3), 293-304.
- 99-Kamiloglu, S. E. N. E. M., Toydemir, G. A. M. Z. E., Boyacioglu, D. I. L. E. K., & Capanoglu, E. S. R. A. (2012). Health perspectives on herbal tea infusions.
- 100- rajam Srividya, A., Sangai Palanisamy Dhanabal, V., & Vishnuvarthan, J. (2012). Mutagenicity/antimutagenicity of plant extracts used in traditional medicine: A review. *World J Pharma Res*, 2, 236-59
- 101- Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M. K., & Rzeski, W. (2017). LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules*, 22(4), 624.
- 102- Alonso-Moraga, A., Anter, J., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Del Río-Celestino, M., Font, R., ... & Muñoz-Serrano, A. (2011). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Toxicology Letters*, (205), S6-S7.

- 103- Singh, N. K., Biswas, A., Rabbani, S. I., Devi, K., & Khanam, S. (2009). Preventive effect of hydroalcoholic extract of *Salacia oblonga* root bark on mitomycin-C induced DNA damage using micronucleus test system in rats. *Pharmacologyonline*, *1*, 127-33.
- 104- Yasmine, B. N., Ourda .Z.,Nouara .B. (2017). Évaluation de l'activité antimutagénique de *Tilia cordata*. (Mémoire pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie.costantine).
- 105- Romero-Jiménez, M., Campos-Sanchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *585*(1-2), 147-155.
- 106- Erikel, E., Yuzbasioglu, D., & Unal, F. (2019). In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *Journal of ethnopharmacology*, *237*, 171-181.
- 107-Hail Jr, N., Cortes, M., Drake, E. N., & Spallholz, J. E. (2008). Cancer chemoprevention: a radical perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, *45*(2), 97-110.
- 108- Yassmin , B., Salma , B., Bouhrour ,NH., Mahdi,B.,(2018).l'application pharmacotoxicologique de test des micronoyaux in vivo.( Mémoire pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie.costantine ) .
- 109- Snijman, P. W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, I. R., & Gelderblom, W. C. (2007). The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose–response effects on mutagen activation–flavonoid interactions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *631*(2), 111-123.
- 110-Beaupré, M., & St-Laurent, D. (1998). Deux causes de décès: le cancer et le suicide. *D'une génération à l'autre: évolution des conditions de vie, BSQ Québec: Les Publications du Québec*, 47-81.
- 111- Hofnung, M. J. (1979). Introduction à l'étude des relations entre mutagenèse et cancérogenèse. *Biochimie*, *60*(10), 1151-1171.
- 112-MEZZOUG, N., EL HAMSS, R., & IDAOMAR, M. Antigénotoxicité de *Nigella sativa*.
- 113- Gheffour, K., Boucherit, K., & Boucherit-Otmani, Z. (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, *13*(5), 288-294.

Présenté par :Belagoune Asma Nour El Houda

Année universitaire : 2018/2019

Rebahi Samia

**Intitulé :**

## **L'application du test micronoyau pour l'évaluation de l'effet antimutagène chez les souris**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Toxicologie et Santé.**

ce travail consiste à l'application d'une méthode permettant l'évaluation de l'effet antimutagène d'une plante appelée tilleul. Nous avons choisi le test des micronoyaux in vivo pour le réaliser.

L'utilisation des plantes qui contiennent des composés bioactifs est en progression . En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle.

Vu que l'étude bibliographique réalisée sur cette espèce a montré qu'elle a des composés phytochimiques possèdent plusieurs effets biologiques et pharmacologiques ,ces composés peuvent agir en tant qu'antioxydants de différentes manières, par piéger les radicaux libres ; renforcer les défenses antioxydantes de l'organisme en captant les radicaux libres et protéger les lipides, les protéines et l'ADN des dommages oxydatifs.ce qui conduit généralement à supposer que la plante a une effet antimutagène .

Ce travail est une étude expérimentale menée au laboratoire sur 15 souris femelles de la souche *SWISS ALBINOS* répartis en 3 lots de cinq rats chacun dont le premier lot sert de témoin négative Recevant le véhicule (l'eau distillée), le second est un lot sert de témoin positive Recevant une injection intra-péritonéale d'une dose unique de 40 mg/Kg du CPA , le troisième est un lot administré l'extrait aqueux de *Tilia Cordata* à raison de 50 mg/kg simultanément avec CPA(meme dose) au 3eme j. À partir de l'analyse

de nos résultats, on observe une diminution considérable des taux de réduction de MN à 32.11% , avec une diminution de la prolifération cellulaire de la moelle osseuse pour la dose que nous avons utilisée.

❖ Donc Notre étude a démontré :

- un effet antimutagénique fort d'extraits aqueux de tilleul .
- un effet myélosuppresseur pour la dose que nous avons utilisée.

**Mots clés :** l'effet antimutagénique, tilleul, *tilia cordata*, MN, in vivo, test des micronoyau, composés phytochimiques, antioxydant, radicaux libres , CPA, effet myélosuppresseur.

## **Abstract:**

The general objective of this work was the application of a method allowing the evaluation of the antimutagenic effect, as well as the study of this effect of a plant called linden (*tilia cordata*). We chose the in vivo micronucleus test to make it.

this work is an experimental study conducted in the laboratory on 15 female mice of the *SWISS ALBINOS* strain divided into 3 lots of five rats each of which the first batch serves as a negative control Receiving the vehicle (distilled water), the second is a batch serves of positive control Receiving an intraperitoneal injection of a dose of 40 mg / kg of CPA, the third is a batch administered the aqueous extract of *Tilia Cordata* at a rate of 50 mg / kg simultaneously with CPA (40mg/kg) on day 3. From the analysis of our results, we observe a considerable decrease in MN cell levels, with a decrease in the proliferation of bone marrow cells for the dose we used .

- ❖ So our study has shown
  - an antimutagenic effect of aqueous extracts of linden .
  - a myelosuppressor effect for the dose we used.

**Key words:** antimutagenic effect, linden, *tilia cordata*, in vivo, micronucleus test, CPA, MN, myelosuppressor effect .



### الملخص:

يتمثل عملنا في استخدام تقنية تسمح بدراسة النشاط المضاد للطفرة الوراثية لنبته الزيزفون. تعتمد هذه التقنية على ملاحظة تأثير مستخلصات النبتة في الحد من ظهور النويات الصغرى التي يسببها السيكلوفوسفاميد. اخترنا لهذا الغرض اختبار النويات الصغرى.. هذا العمل عبارة عن دراسة تجريبية أجريت في المختبر على 15 فار من سلالة *SWISS ALBINOS* مقسمة إلى 3 مجموعات، تتشكل كل مجموعة من خمس فئران. المجموعة الأولى عبارة عن شاهد (يعالج بالماء المقطر)، والثانية تحقن مرة واحدة بجرعة 40 ملغ / كغ من CPA داخل الصفاق، أما الثالثة فتعالج بمنقوع الزيزفون بجرعة 50 ملغ / كغ تزامنا مع حقن السيكلوفوسفاميد بجرعة 40 ملغ / كغ في اليوم الثالث.

من تحليل نتائجننا، نلاحظ انخفاض كبير في مستوى النويات الصغرى في الخلايا البنت (MNPCE) بنسبة 32.11% هذا ما يثبت مفعول مستخلصات الزيزفون كمضادات للطفرة الوراثية، لكن يصاحب ذلك انخفاض في تكاثر و تمايز خلايا نخاع العظام بالنسبة للجرعة المستخدمة.

### الكلمات المفتاحية

التأثير المضاد للطفرة الوراثية، الزيزفون، اختبار النويات، السيكلوفوسفاميد، النويات الصغرى، نخاع العظام.

**Laboratoire de Pharmacologie , département de pharmacie, Université Constantine3**

Jury d'évaluation :

**Président du jury : Menad Ahmed (Professeur- UFM Constantine).**

**Rapporteur : Dr. Derouiche Mohamed Taha (Maitre Assistant en Pharmacie- Constantine 3).**

**Examineurs : Benrebai Mouad (Maitre de conférence A- UFM Constantine).  
Kandouli Chouaib (Maitre de conférence B- UFM Constantine )**

**Date de soutenance : 04/09/2019**