

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A/Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de la Biologie Physico-Chimique

Mémoire

En vue de l'obtention de diplôme de Master

En : Génétique cellulaire et Moléculaire

Option : Génétique Appliquée

Thème

*Evaluation de la génotoxicité et l'anti-génotoxicité
des extraits bruts de feuilles et de l'écorce de
Fraxinus angustifolia in vivo*

Présenté par : Melle SIDANI Meriem

Melle ZEMOURI Hadjira

Soutenu le : 08/ 06/2014

Devant le jury :

Président: Melle Tahiri O. (M.A.A., UAMB)

Promotrice: Melle Ayouni K. (M.A.A., UAMB)

Co promotrice: Mme Debbache N. (M.A.A., UAMB)

Examineurs: Melle Cherift N. (M.A.B., UAMB)

Mme Ouahmed H. (M.A.A., UAMB)

2013/2014

Remerciement

Avant tous et après tous nous remercions le dieu le tout puissant de nous avoir accordé la patience et la santé pour bien continuer et bien mené ce travail à terme et en bonne conditions.

Nous tenons a remercié Mr et Mme Atmani de nous avoir accordé l'autorisation d'accès au laboratoire de génétique.

Nous remercions Melle Ayouni Karima d'avoir accepter d'encadrer ce travail et de nous guider avec beaucoup de patience.

Notre profonde gratitude à Mme Debbache d'avoir accepté d'être avec nous le jour de la soutenance

Un grand remerciement aux enseignants qui nous on guidé durons notre stage au niveau du laboratoire.

Nous tenons à remercier les membres de jury d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous remercions toute personne avait participé à notre formation depuis le collège jusqu'à présent.

Hadjira et Meriem

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A ceux qui m'ont permis de voir la lumière du jour, ceux qui m'ont suivie pat par pat durant mon parcours, ceux à qui je dois ma force, ma patience et mon courage, ceux qui sont toute ma vie, mes très chers parents
Nouredine et Saida.*

*A mes grands parents qui m'ont entouré par leurs conseils et amours :
Abderrahmane, Zouina et Fatma.*

A mes deux chers et adorables frères : Imad et Roujedi.

A ma petite princesse : ma sœur Loubna.

A mon cousin Salim et sa famille : Hakima, Ghilas et badis.

A mes deux cousins Nabil et Nacer.

A celles avec qui j'ai partagé ma vie universitaire ; mes copines de chambre : Houa, Siham et lamia.

A mes cousines : Amel, Siham, Kahina, Salima et Nabila.

A tous mes oncles et mes tantes surtout Louisa et Soria .

A mes très chères amies : Sabrina, Hamida et Rima.

A ceux qui ont partagé des moments avec moi et ceux que j'aime.

A celle avec qui j'ai partagé le stress, l'inquiétude et surtout les moments de ce travail : ma collègue et mon amie Meriem.

Hadjira

Dédicaces

Avec l'aide du bon Dieu, le tout puissant, ce travail est achevé ; je le dédie à toutes les personnes qui m'ont soutenue toute la période de mes études :

A mon père Salah qui a consacré sa vie pour me rapporté tout le confort dont j'avais besoin pour avancer dans mes études,

A ma très chère mère Zoulikha qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, pour son dévouement afin d'assurer mon éducation et pour tout ses conseils précieux,

A ma petite très chère sœur : Ismahane,

A ma très chère grande sœur : Karima et son marie Madjid

A ma petite princesse : ma nièce Meline

A mes deux chères frères : Hanafi et Rodi

A mon unique oncle : Belkacem

A ma chère cousine : Selwa et mes copines : Warda, Kahina, Sabrina et Radia

A ma chère amie Farida et à toutes sa familles

A ceux qui ont partagé des moments avec moi et ceux que j'aime.

A celle avec qui j'ai partagé le stress, l'inquiétude et surtout les moments de ce travail : ma collègue et mon amie Hadjira.

Meriem

Liste des abréviations

A. cepa : *Allium cepa*

A : Adénosine

AC : Aberration chromosomique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP : Anaphase perturbée

AS : Azide de sodium

C : Cytosine

CM : C-mitose

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EE : Extrait d'écorce

F. angustifolia : *Fraxinus angustifolia*

EF : Extrait de feuille

G: Guanine

G1: Gap 1

G2: Gap 2

IM: Indice mitotique

LOH: Loss of heterozygosity

M: mitose

MN : micronoyaux

MP : Métaphase perturbée

MS : Spectromètre de masse

NaN₃ : Azide de sodium

S: Synthèse

T : Thymine

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Photographie de l'arbre <i>Fraxinus angustifolia</i> .	4
02	Formules chimique de quelques coumarines.	7
03	Structure chimique des flavonoïdes	7
04	Structure chimique (a) des tanins hydrolysables, (b) des tanins condensés	9
05	Structure chimique de lignane	9
06	Structure chimique de quelques secoiridoids.	10
07	Structure chimique de Verbascoside	10
08	Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants	15
09	Diversité des altérations de l'ADN (Lésions et mutations)	17
10	Photographies des feuilles (a) et de l'écorce (b) de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	22
11	Photographies d' <i>Allium cepa</i> immergé dans des flacons de culture (a), et incubé dans l'étuve (b).	25
12	Photographies de la mesure de la longueur des racines (a) et de leurs stockages dans l'éthanol 70% (b).	27
13	Photographies des aspects des racines de <i>Allium cepa</i> dans les différents traitements .	29
14	Histogramme des résultats des contrôles négatifs des racines de <i>Allium cepa</i> (Eau distillée et DMSO).	32
15	Photographies des divisions normales des cellules méristématiques de <i>Allium cepa</i> .	33
16	Histogramme représentant les résultats de l'indice mitotique des bulbes traités par l'azide de sodium (NaN ₃).	34
17	Photographies des anomalies chromosomiques induites par l'azide de sodium	35
18	Histogramme des résultats de génotoxicité des extraits d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	37
19	Photographies des anomalies causées par les extraits des feuilles et des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i>	38
20	Histogramme représentant les résultats de du test de génotoxicité des extraits des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	40
21	Photographies des anomalies chromosomiques des racines de <i>Allium cepa</i> causées par l'extrait de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	41
22	Histogramme des résultats du traitement combiné par les extraits d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> et l'azide de sodium	42
23	Photographies des anomalies chromosomiques causées lors du traitement anti-génotoxique des extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	43
24	Histogramme d'antigénotoxicité des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et l'azide de sodium.	44
25	Photographies des aberrations chromosomiques lors du traitement antigénotoxique des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	45

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Quelques plantes médicinales et leurs usages traditionnels	3
II	Quelques plantes médicinales et leurs effets thérapeutiques.	12
III	Tableau récapitulatif des traitements des bulbes d' <i>A. cepa</i> .	26
IV	Résultats des mesures de la croissance des racines de <i>Allium cepa</i> .	30
V	Pourcentage d'aberrations chromosomiques induites par l'azide de sodium (NaN ₃).	36
VI	Pourcentages des aberrations chromosomiques lors du traitement avec l'extrait de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	39
VII	Tableau de pourcentage d'aberrations chromosomiques lors du traitement avec l'extrait de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	41
VIII	Pourcentage d'aberrations chromosomiques lors du traitement combiné d'azide de sodium et l'extrait de l'écorce	43
IX	Pourcentage des aberrations chromosomiques lors du traitement antigénotoxique par les extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	45

SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les plantes médicinales et la phytothérapie	2
2. <i>Fraxinus angustifolia</i>	3
2.1 Caractères botanique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	4
2.2. Applications de <i>Fraxinus angustifolia</i> dans la médecine traditionnelle.....	5
2.3. Pharmacodynamique de <i>Fraxinus</i>	5
2.4. Les molécules bioactives de <i>Fraxinus Angustifolia</i>	6
3. Rappel du cycle cellulaire.....	13
4. Agents mutagènes et mécanisme d'action.....	14
4.1. Agents physiques.....	14
4.2. Agents chimiques.....	15
5. Les type de dommages de l'ADN induites par les substances mutagènes.....	17
6. Tests de génotoxicité.....	18
6.1. Test de Ames.....	18
6.2. Test de comète.....	19
6.3. Test de micronoyaux.....	19
6.4. Test des aberrations chromosomiques.....	19
6.5. Test de <i>Allium cepa</i>	20

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériels.....	22
1.1. Matériel végétal.....	22
1.1.1 <i>Fraxinus angustifolia</i>	22
1.1.2 <i>Allium cepa</i>	23
1.2. Produits chimiques.....	23
1.3. Equipement et matériels de laboratoire.....	23
2. Méthodes.....	24
2.1. Préparation des échantillons de <i>Fraxinus angustifolia</i>	24
2.2. Extraction.....	24
2.3. Test de génotoxicité.....	24
2.4. Examen microscopique.....	28
2.5. Analyse statistique.....	28

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats.....	29
1.1 Résultats de l'extraction.....	29
1.2. Résultats de l'observation macroscopique et mesure de la longueur des racines.....	29
1. 3. Résultats du test d'évaluation de la génotoxicité.....	31
1.3.1. Résultats du traitement par l'eau distillée et le DMSO (contrôles négatifs).....	32
1.3.2. Résultats du traitement par l'azide de sodium (Contrôle positif).....	34
1.3.3. Extraits d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	37
1.3.4. Extraits des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	40
1.4. Résultats de l'activité anti-génotoxique des extraits de <i>F.angustifolia</i>	42

1.4.1. Traitement combiné par les extraits d'écorce et l'azide de sodium.....	42
1.4.2. Traitement combiné par les extraits de feuilles et l'azide de sodium.....	44
2. Discussion.....	46
2.1. L'extraction.....	46
2.2. Tests de génotoxicité / antigénotoxicité.....	46
2.2.1. Taux de croissance des racines.....	47
2.2.2. Indice mitotique.....	48
2.2.3. Aberrations chromosomiques.....	50
Conclusion	53
Références bibliographiques.....	55
Annexes.....	i

Introduction

Les plantes, un élément vital de la diversité biologique, servent essentiellement au bien de l'être humain, elles ont un rôle important dans la culture et un fort potentiel économique pour l'alimentation, l'énergie, l'habillement et dans la construction des logements (**Mpondo et al., 2012**). Un autre rôle très important, découvert depuis longtemps par nos ancêtres, l'usage des plantes dans la médecine traditionnelle. Plus de 3000 plantes sont qualifiées de plantes médicinales pour leur pouvoir de guérison et leur potentiel thérapeutique, elles peuvent être utilisées entièrement ou en partie (feuille, écorce, bourgeons ...) (**Shretha, 2004**). Malgré leur grand potentiel prometteur, elles ne restent pas sans danger, c'est pour cela l'étude thérapeutique s'avère souvent d'une importance majeure, afin de connaître la partie, les constituants ainsi que la dose toxique et non toxique de la plante.

Dans la phytothérapie, les extraits de plantes médicinales sont employés car ils contiennent des mélanges de métabolites secondaires (**Fransworth et al., 1986**), il existe plusieurs types des extraits, selon le solvant employé et la partie du végétal (feuilles, écorce, ...), influençant le type de métabolites extraits. Les métabolites secondaires des plantes ont été trouvés impliqués dans plusieurs activités biologiques, notamment antioxydante (**Skерget et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2008 ; Atmani et al., 2009 ; El Ouariachi et al., 2014**) et anti-inflammatoire (**Yi et al., 2007 ; Yuet et al., 2012**).

Cette présente recherche s'est intéressée à une plante médicinale locale appelée *Fraxinus angustifolia* avec un nom commun frêne à feuilles étroites, dotée d'un pouvoir thérapeutique intéressant, elle fait partie de la famille des Oléacées (**Calis et al., 1993**), endémique du bassin méditerranéen, incluant le nord algérien (**Do, 1972 ; Gaedcke, 1993**).

Les extraits des plantes contiennent différents métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, les coumarines, les tanins... qui lui confèrent plusieurs vertus thérapeutiques et activités biologiques tels que : anti-inflammatoires : (**Tsai, 2004**), antivirales (**Bylka et al., 2004 ; Tapas et al., 2008**), et antiallergiques (**Marfak, 2003**).

Le but de cette étude est de mettre en évidence les effets génotoxiques et antigénotoxiques des extraits bruts de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, comparativement à un mutagène chimique l'azide de sodium, par un test de génotoxicité qui permet d'évaluer l'impact de différentes substances chimiques sur la division cellulaire et le génome d'une espèce eucaryote, *Allium cepa*.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I .1.Les plantes médicinales et la phytothérapie :

L'impact de l'environnement sur l'être humain est trop large et il l'exploite afin de parvenir à ces besoins. Cet environnement et la grande pharmacie très prometteuse de nos ancêtres, car il renferme une grande variété de plantes qui guérissent leurs maladies, donc l'usage de ces plantes en médecine est trop ancien et il revient à 3000 ans av J.C, où le premier texte connu sur la médecine par les plantes a existé. La découverte de cette médecine a eu lieu lors de l'observation des animaux qui consomment des herbes non incluses dans leur régime alimentaire. En 1993, un anthropologue américain a observé des chimpanzés qui consomment des feuilles d'*Aspilia mossambicensis* qui révèlent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antiparasitaires. Une plante médicinale est donc par définition une plante utilisée dont le but de prévenir, soigner ou soulager divers maux. C'est une drogue végétale qui possède en moins une partie à propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains, ceci après avoir fait preuve d'un pouvoir de guérison et d'un rôle prometteur dans la prévention de diverses maladies, comme le désordre de sommeil soigné par la Valériane (*Valeriana officinalis*) et le désordre d'inquiétude soigné par Kava Kava (*Piper methysticum*) (**Donath et al., 2000**).

Les plantes médicinales ont fait l'objet de plusieurs études sur différentes pathologies comme l'hypertrophie, le cancer, le SIDA... et leur utilisation a été reprise en considération dans les années récentes (**Kruch, 1982**). La reconnaissance de leurs valeurs chimiques, pharmaceutiques et économiques continues de croître, mais cela varie selon les pays. L'industrie pharmaceutique continue à utiliser ces plantes, de plus en plus, car il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur ou encore l'éphédrine que l'on trouve dans de nombreuses prescriptions contre le rhume (**Brunetont, 1999**). Cette médecine est appelée phytothérapie qui signifie « soigner par les plantes » (**Gahbiche, 2009**). Elle est reconnue comme une médecine douce, alternative et naturelle, subdivisée en cinq types : l'aromathérapie qui utilise les essences et les huiles des plantes, la gemmothérapie qui s'intéresse aux extraits alcooliques des tissus jeunes des végétaux, l'herboristerie qui est la plus ancienne et la plus classique, l'homéopathie qui fait recours aux plantes d'une façon prépondérante et enfin la phytothérapie pharmaceutique qui utilise les produits végétaux obtenus par extraction (**Bruneton, 1999**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I: Quelques plantes médicinales et leurs usages traditionnels.

La plante	Le nom scientifique	L'effet thérapeutique
Menthe poivrée	<i>Mentha x piperitan</i>	Anesthésiant (Santoro et al., 2011 ; Scopel et al., 2014)
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	
Absinthe	<i>Artemisia absinthium L.</i>	Antiseptique (Bailen et al., 2013 ; Dvaranauskait et al., 2009 ; Pirbalouti et al., 2013)
Ail	<i>Allium sativum</i>	
Cassis	<i>Ribes nigrum</i>	
Lavande	<i>lavendula officinalis</i>	
Thym commun	<i>Thymus vulgaris</i>	
Cassis	<i>Ribes nigrum</i>	Anti-inflammatoire et anti-rhumatologique (Woodhead et al., 1998; Garcia et al., 2011).
Frêne	<i>Fraxinus excelsior</i>	
Prêle des champs	<i>Equisetum arvense</i>	
Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Anti-cancer (Ferreira et al., 2013 ; John et al., 2014) .
Ginkgo	<i>Ginkgo biliba</i>	
If	<i>Taxus baccata</i>	
Le Gogi	<i>Lycium barbarum</i>	Antioxydant (Edwards et al., 2003 ;Wang et al., 2014).
L'Argousier	<i>Hippophae rhumanoides.L</i>	
La galère (Physalie)	<i>Physalia physalis</i>	
Réglisse	<i>Glycyrriza glabra</i>	Diurétique (Fenwick et al., 1990 ; Steven et al., 1997).
Galga	<i>Galga officinalis</i>	
Genivère	<i>Juniperus communis.L</i>	

Le nord de l'Afrique est riche en plantes médicinales mais leurs exploitations restent restreintes et les recherches scientifiques ne sont pas trop avancées, *Fraxinus angustifolia* est parmi ces plantes médicinales.

I.2. *Fraxinus angustifolia* :

Fraxinus venue du mot grec fraxis qui signifie la clôture, reconnue par le nom frêne oxyphyle, en anglais narrow leaved Ash (**Wallander, 2008**), dardar en arabe et asléne est le nom berbère. Il fait partie de la famille des Oléacées (**Calis et al., 1993**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

C'est une espèce autochtone, héliophile et hermaphrodite, cette arbre à besoin de l'humidité, il préfère les sols riches en bases avec un pH basique à neutre (Do, 1972). Le genre *Fraxinus angustifolia* a plusieurs synonymes: *Fraxinus oxycarpa*, *Fraxinus pallisias*, *Fraxinus potamophila*, *Fraxinus sodgiana bung*, *Fraxinus syriaca boiss* mais *Fraxinus angustifolia* est l'appellation la plus courantes.

I. 2.1 Caractères botanique de *Fraxinus angustifolia* :

Cet arbre peut atteindre une hauteur maximale de 25 m (Figure1). (Wallander, 2008), son écorce est de couleur grise, les bourgeons sont de couleur marron, les feuilles peuvent être regroupées sous forme d'une seule feuille et elles prennent une longueur entre 15 à 25 cm, ses fruits sont des samares (Yildiz et al., 2009). Elle se répartie dans les régions du sud et du centre de l'Europe, l'ouest de la Russie (Wallander, 2008) ainsi que dans l'ouest de l'Asie et le Nord africain, notamment l'Algérie et le Maroc (Grand, 2006; Yildiz et al., 2009). Cette espèce se trouve aux bords des rivières, des bois et des habitations, sa longévité est de 150 à 200 ans (Do, 1972).



Figure 01 : Photographie de l'arbre *Fraxinus angustifolia*.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.2.2. Applications de *Fraxinus angustifolia* dans la médecine traditionnelle :

Cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle dans différents pays du monde et ceci pour son effet diurétique et purgatif, ainsi que pour le traitement de la constipation, hydropisie, l'arthrite et les douleurs rhumatismales. L'écorce et les feuilles sont impliquées dans la médecine traditionnelle bulgare et polonaise contre plusieurs maladies, y compris la cicatrisation, les diarrhées et la dysenterie (**Hosny *et al.*, 1991 ; Kostova et Iossifova, 2007**).

La commission allemande a listé les gélules préparées par les feuilles de *Fraxinus angustifolia* dans la liste des herbes non approuvées, par contre ces gélules sont décrites dans différentes pharmacopées (française VIII, Helvetica, Ausgab...) (**Gaedcke, 1993; Pautasso *et al.*, 2013**), *Fraxinus angustifolia* est aussi utilisée dans le cas des problèmes du foie, la goutte, les douleurs du rein, l'œdème et les douleurs cervicales, ces feuilles sont aussi utilisées dans le traitement des blessures et les ulcères (**Blumenthal *et al.*, 1998; Alameda et Villar, 2012**).

I.2.3. Pharmacodynamique de *Fraxinus* :

La pharmacodynamique désigne l'étude des interactions de l'extrait de la plante dans l'organisme, son action moléculaire et ses effets positifs ainsi que leurs effets indésirables dont le but de trouver le remède parfait (**Ghedira, 2005**). Les espèces de *Fraxinus* ont fait l'objet de plusieurs investigations pour étudier leurs activités biologiques.

I.2.3.1. Activité antimicrobienne :

L'extrait des feuilles de genre *Fraxinus* a supprimé l'augmentation des moisissures *Limeticola gloeosporum* et *Tennis Alternaria*, de même les extraits aqueux des feuilles ont montré l'inhibition de la croissance de *Candida albicans* (**Kostova et Iossifova, 2007**). Les extraits éthanoliques de *Fraxinus* ont révélé une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Leptospira ponom* (**Tshebiso *et al.*, 2014**).

I.2.3.2. L'activité inhibitrice d'AMPC phosphodiesterase et lipoxygénase :

Le scopoletin et la fraxine, isolés des écorces du genre *Fraxinus* ont une forte capacité inhibitrice de l'AMPC phosphodiesterase, l'esculetine, la fraxetine et le penorésinol lignanes sont également actifs (**Kostova et Iossifova, 2007**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

L'esculetine et le diacétate ont un rôle principal dans la méthylation et la glycosylation de l'ADN, ceci conduit à une perte d'activité (inhibition de la réplication de l'ADN), donc ces constituants ont un effet cytotoxique (**Galabov et al., 1996**).

I.2.4. Les molécules bioactives de *Fraxinus angustifolia* :

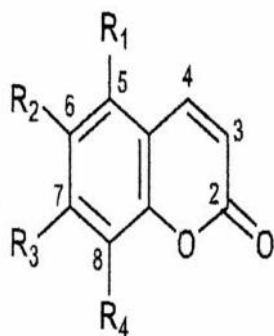
Dans le règne végétal, on trouve des métabolites primaires qui regroupent les acides aminés, les lipides, les sucres, les acides nucléiques...etc. ils jouent un rôle important dans la nutrition, ils assurent la croissance, le développement des organismes et les métabolites secondaires qui jouent un rôle écologique important, notamment en contribuant aux phénomènes de communication et de défense (**Tonon et al., 2001 ;Harkati, 2011**).

Plus de 100000 métabolites secondaires ont été identifiés et classés en trois groupes : les phénols, les azotés et les terpènes. *Fraxinus* contient beaucoup plus de phénols qui jouent un rôle très important dans l'activité génotoxique et cytotoxique, notamment les coumarines (esculine, esculetine, fraxine, fraxitine, scopoletin, isoscopoletin (**Iossifova et Evstatieva, 1997**), les secoiridoids notamment le ligstroside et oleuropein, les lignanes, les flavonoïdes, les phenylpropanoïdes et des phénols simples (**Calis et al., 1993; Hosney et al., 1998**).

I.2.4.1. Les coumarines :

Isolés pour la première fois en 1820, leur nom vient du «cumaru» langue amazonienne, ce sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 (**Sereme et al., 1995**).

Ce sont des composés naturels organiques et aromatiques connues dans la nomenclature internationale comme 2-H-1- benzopyrane-one, il s'agit de composés à neuf atomes de carbones possédant le noyau benzo (2H)-1 pyranone 2, ce dernier dériverait de la cyclisation de l'acide *cis*-cinnamique oxygéné en C2 (**Harkati, 2011**). La majorité des coumarines sont substitués en C7 par un hydroxyle. Les auteurs ont classé les coumarines selon la nature des substituants ainsi que leurs structures en cinq catégories : Coumarines simples, Furanocoumarines, Pyranocoumarines, Dicoumarines, Tricoumarines. Chez *Fraxinus* on trouve sept composés de coumarines (**Figure 02**) (**Iossifova et al., 1997**).

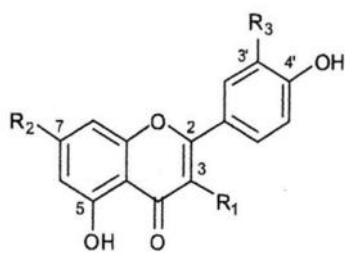


Les coumarines	R1	R2	R3	R4
Esculetin	H	OH	OH	H
Esculine	H	OGlu	OH	H
Fraxetin	H	OMe	OH	OH
Fraxin	H	OMe	OH	OGlu
Scopoletin	H	OMe	OH	H
Isosopoletin	H	OH	OMe	H
Cichorin	H	OH	OGlu	H

Figure 02 : Formules chimique de quelques coumarines (Kostova et Iossifova, 2007).

I.2.4.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes partagent la même structure chimique de base (**Figure 03**), ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques A et B reliés entre eux par une chaîne en C₃ pour former l'hétérocycle (C) (**Bruneton, 1999**).



Les flavonoides	R1	R2	R3
Quercetin	OH	H	H
Rutin	O-Glu ₆ -Rha	OH	OH
Kaempferol	OH	OH	H

Figure 03 : Structure chimique des flavonoïdes (Bruneton, 1999; Ghedira, 2005 ; Kostova et Iossifova, 2007)

Les flavonoïdes ont été subdivisé en plusieurs classes, selon le degré d'oxydation du noyau puranique central, on distingue : Les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les flavanes, les flavanols et les anthocyanines. De plus, le noyau puranique central peut être ouvert pour donner les chalcones et recyclisé en un noyau furanique (aromes) (**Brunton, 1999; Marfak, 2003 ; Skerget et al., 2005 ; Hollman et al., 2007**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Selon **Hadi 2004** les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal, cependant ils sont rares chez les végétaux inférieurs. Les flavones et les flavonones sont les plus répandus et ils caractérisent le genre *Fraxinus* où la quercétine, le Kaempférol et leurs glycosides sont souvent présents (**Figure 03**) (**Ghedira, 2005 ; Kostova et Iossifova, 2007**).

Ces flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés biologiques comme anti-radicalaires par leurs pouvoir à piéger les radicaux libres et former des radicaux flavoxyles moins réactifs (**Amic et al., 2003**), chélateurs des ions métalliques, qui sont liés à l'origine d'une peroxydation lipidique et le stress oxydatif (**Bouhleb et al., 2008 ; Tiquwari, 2001**), antibactériens (**Cowan, 1999**), anticancéreux (**Pincemail et al., 1999; Brusselmans et al., 2005**), anti-inflammatoires (**Nijveld et al., 2001 ; Tsai, 2004**), antiviraux (**Bylka et al., 2004 ; Tapas et al., 2008**), et antiallergiques (**Marfak, 2003**).

I.2.4.3. Les tanins :

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000, utilisés dans la préparation du cuir (**Bruneton, 1997**). A coté des réactions classiques des phénols (coloration vert-bleu au test de chlorure ferrique), ils ont une propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Haslam, 1996 ; Cowan, 1999**). Les tanins se trouvent pratiquement dans toutes les parties des végétaux : écorce, bois, feuilles, fruits et racines (**Scalbert, 1991**) et ils jouent le rôle de protection des plantes contre les parasites et les prédateurs (**Haoyu et al., 2014**).

Sur la base de leur structure chimique, les tanins sont classiquement divisés en deux groupes:

❖ **Les tanins hydrolysables** : Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est généralement le D-glucose et l'acide phénol soit l'acide gallique (gallotanins) ou bien l'acide éllagique (éllagitanins) (**Figure 04a**) (**Cowan, 1999**).

❖ **Les tanins condensés** : ils n'ont pas du sucre dans leurs molécules et leurs structures est voisine de celle des flavonoïdes car ils possèdent un squelette en C6-C3-C6 comprenant deux cycles aromatiques, les cycles A et B (C6) et un hétérocycle oxygéné, le cycle C (**Figure 04b**), ils ont été identifiés dans tous les groupes des végétaux supérieurs (**Bruneton, 1999**).

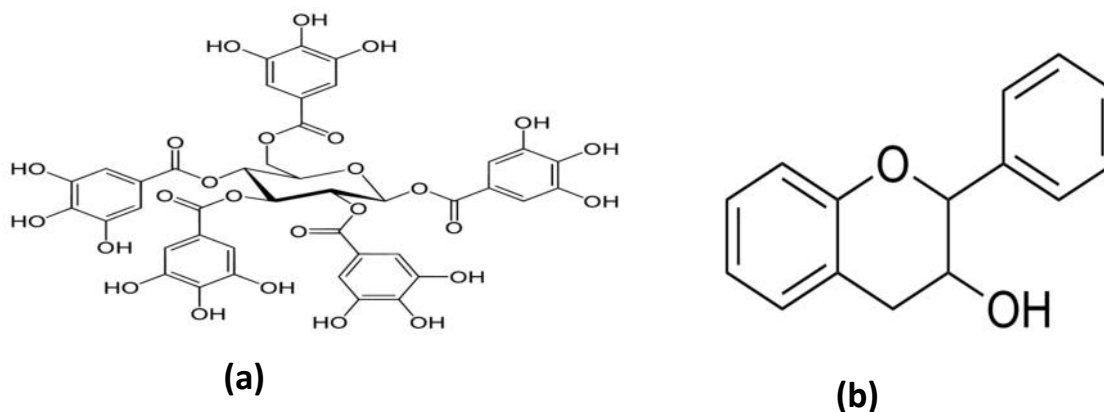
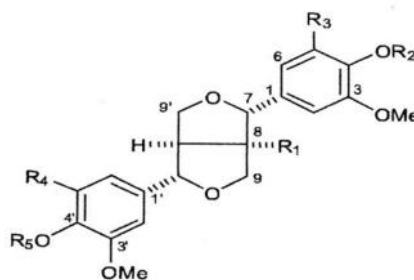


Figure 04 : Structure chimique (a) des tanins hydrolysables, (b) des tanins condensés (Cowan, 1999 ; Bruneton 1999).

I.2.4.4. Les lignanes et les lignines :

Les lignanes répondent à une présentation structurale de type $(C_6C_3)_2$. Les plantes les élaborent par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique, lorsqu'il y a une liaison directe C-C entre les unités C_6C_3 mais liés par un atome d'oxygène d'éther, le composé est appelé oxynéolignane tels que les sésquinéolignanes (3unités de C_6C_3) et les dinéolignanes (quatre unités de C_6C_3).

Les lignines constituent une classe importante de produits dans le règne végétal et seraient formés par polymérisation oxydative de monoligols, qui sont les alcools *P*-coumarique, coniférique sinapique (Sakagami *et al.*, 2005). Les lignanes présentent chez *Fraxinus angustifolia* sont représentés dans la **figure 05**.



Lignanes	R1	R2	R3	R4	R5
(+)-pinoresinol-4'-O- -D-glucopyranoside	H	Glu	H	H	H
(+)-1-hydroxypinoresinol-4'-O- -D-glucopyranoside	OH	Glu	H	H	H

Figure 05: Structure chimique des lignanes de *Fraxinus angustifolia* (Hosny, 1998)

I.2.4.5. Les Secoiridoids :

Ce sont une classe de métabolites secondaires trouvés dans une grande variété de plantes, les monoterpènes. Les plus répandus chez *Fraxinus angustifolia* sont : ligstroside et oleuropein (Hosny *et al.*, 1991 ; Çalis *et al.*, 1996); fraxicarboside A [6"-hydroxyoleuropein O-trans-p-coumaroyl-10], fraxicarboside B [6"-O-trans-caffeoyl-10-hydroxyoleuropein], fraxicarboside C [cétyle de 3" O 6"-O-trans-caffeoyl-10 - hydroxyoleuropein], 10-hydroxyoleuropein, 10-hydroxyligstroside (Hosny, 1998); ligstral, angustifoliosides [6"O-(β-D-glucopyranosyl)-oleuropein] et B [6"-O-(β-D-glucopyranosyl) - ligstroside] (Hosny *et al.*, 1991; Çalis *et al.*, 1996); nuezhenide, angustifolioside C [6 f-O-(fÀ-D-glucopyranosyl)-neoleuropein] (Calis *et al.*, 1996); ligstrobutyl, oleobutyl, penta-Omethyl - ligstroside, tetra O methyl-oleoside (Figure 06) (Calis *et al.*, 1996).

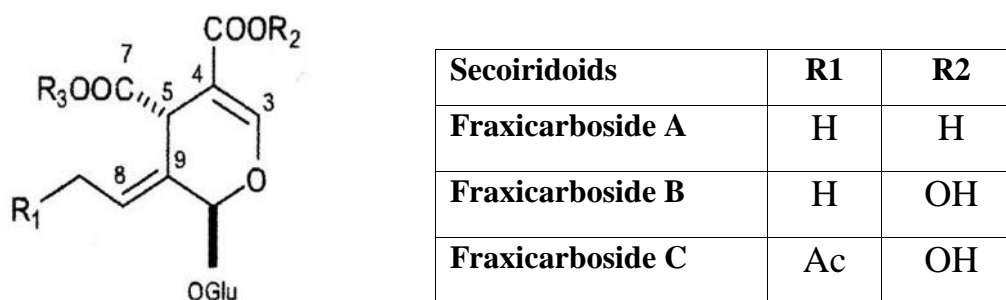


Figure 06 : Structure chimique de quelques secoiridoids (Calis *et al.*, 1996).

I.2.4.6. Phenylpropanoids :

Le seul trouvé chez *Fraxinus angustifolia* est Verbascoside (acteoside) (Figure 07) (Hosny, 1998)

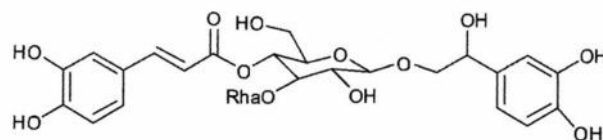


Figure 07 : Structure chimique de Verbascoside (Hosny, 1998) .

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Dans le but de décélérer une ou plusieurs activités biologiques, les extraits de plantes, préparés à l'aide de différents solvants, sont soumis à une série de tests biologiques et pharmacologiques qui, à plusieurs reprises, se sont révélés positifs ; concluant que ces plantes sont pourvues d'activités biologiques prometteuses pour des usages thérapeutiques (**Tableau II**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau II : Quelques plantes médicinales et leurs effets génotoxiques et/antigénotoxiques.

Plantes médicinales	Méthodes	Mutagène	Résultats	Composés actifs	Références
<i>Achyrocle satureoids</i>	-Phage Microscreen -test de Ames -SOS spot chromotest	-Azide de sodium Nitroquinoline -1-oxide -Hydrogen peroxide	Mutagénique et génotoxique	-Guercetin -3-methoxyquercetin -Flavonols, -Luteolin flavone -caffeic acid	Vargas et al., 1990
<i>Erythrina velutina</i>	Test <i>Allium cepa</i>	MMS	Génotoxique et antigénotoxique	-Flavonoids -Saponins -Tannins	Deborah et al., 2013
<i>Distephas angulifols</i>	Test de <i>Allium cepa</i>	maleic hydrazide	Cytotoxicité et génotoxicité	-Sesquiterpene lactones - Vernangulide A, -Vernangulide B, -Vernodalol, - Vernodalin-dihydroxyvernodaline	Chukwujekwu et Van Staden, 2014
<i>Centilla asiatica L</i>	Test d'aberrations chromosomiques	Cyproterone acetate (CPA)	Non génotoxique	-extrait de feuilles	Siddique et al., 2007
<i>Nitraria retusa</i>	Test de Ames	MMS	Mutagénique, antimutagénique et antioxydant	Tannins -Flavonoid -Polyphenols -Sterols	Boubaker et al., 2010
<i>Thymus broussonetii</i>	GC and GC-MS	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	antioxydant	-Carvacrol	El Ouariachi, et al., 2014
<i>Solanum sessiliflorum Dunal</i>	-Test de comet -Test micronoyaux	Doxorubicin	Cytotoxicité, génotoxicité et antigénotoxicité	Caroténoïde et les composés phénoliques	Hernandes et al., 2014

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Dans le but d'étudier l'effet génotoxique et antigénotoxique des extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, la reconnaissance des différents stades de division cellulaire est indispensable, pour ceci il est nécessaire de faire un rappel sur le cycle cellulaire.

I.3. Rappel du cycle cellulaire :

Une cellule est capable de se reproduire à l'identique par division cellulaire. Cette phase particulière de sa vie est précédée d'une duplication des éléments importants de la cellule, tels que le matériel génétique, ce qui donne deux cellules filles identiques entre elles et identiques à la cellule initiale. Le passage d'un état unicellulaire à un ensemble de cellules issues de la division de cette cellule est donc rendu possible par répétition d'un processus cyclique : le cycle cellulaire (**Bassaglia, 2001**).

Le cycle cellulaire est essentiellement constitué de quatre phases successives: G1 ; S ; G2 ; M. (**Meijer, 2000**).

- **La phase G1** : est une phase de repos apparent, typiquement c'est la phase la plus longue et la plus variable du cycle cellulaire (**Thomas et al., 2004**). Elle correspond à la phase de croissance optimale où les organites sont réparties dans le cytoplasme, et exploités au mieux de leurs capacités (**Bassaglia, 2001**).
- **La phase S** : dite de synthèse, correspond à la période de duplication d'ADN, permettant de passer de $2n$ à $4n$ chromosomes (**Thomas et al., 2004**).
- **La phase G2** : est une étape de transition, qui permet à la cellule de se préparer à la division mitotique (**Thomas et al., 2004**).
- **La phase M** : la mitose donne naissance à deux cellules filles possédant chacune l'intégrité de l'information génétique de la cellule initiale, c'est la période de cycle cellulaire pendant laquelle les chromosomes sont bien visibles (**Bassaglia, 2001**).

La mitose est un phénomène continu, mais traditionnellement divisé en cinq étapes remarquablement constantes dans le monde des eucaryotes (**Thomas et al., 2004**). La prophase est caractérisée par la condensation progressive des chromosomes à partir de la chromatine, et la mise en place du fuseau mitotique. La prométaphase est marquée par la disparition de l'enveloppe nucléaire. La métaphase représente une étape intermédiaire pendant laquelle les chromosomes sont alignés en plaque équatoriale. L'anaphase (ascension polaire) permet la séparation des chromatides de chaque chromosome et leur migration vers le pôle du fuseau: c'est la phase de répartition de l'information génétique.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Enfin, la télophase permet la décondensation des chromosomes, la reconstitution de l'enveloppe nucléaire, et la disparition du fuseau. En parallèle, à partir d'anaphase et pendant la télophase, la cytotdiérèse permet la division du cytoplasme (**Pines et Rieder, 2001**).

La régulation des différentes phases du cycle cellulaire par les facteurs intra et extracellulaires est souvent perturbé par l'intervention des différentes agents mutagènes.

I.4. Agents mutagènes et mécanisme d'action

L'ADN est le support universel d'hérédité contenant des êtres vivants. Il assure le fonctionnement cellulaire des organismes et permet à la cellule de rester réactive aux messages de son environnement (**Elespuru et al., 2007**). Les perturbations de la molécule d'ADN provoquent des mutations qui peuvent être induites par divers agents chimiques et physiques (**Naoko et Sadao, 1995**).

I.4.1. Agents physiques :

I.4.1.1. Rayonnement non ionisantes (les ultraviolets) :

Les radiations ultraviolettes (UV) sont classées en trois groupes, en fonction de la longueur d'onde: les UVC (190 à 280 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVA (320 à 400 nm). Les UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques (**Pfeifer, 1997**). La lumière UV est fréquemment utilisée au laboratoire pour induire des mutations, particulièrement la dimérisation des bases pyrimidiques (T, C) à l'origine de lésions mutagènes voir même très létales. Les conséquences les plus graves de l'exposition aux UV sont les transitions GC en AT, des mutations décalantes et des délétions et la formation des dommages oxydatifs de l'ADN (**Ding et al., 2008 ; Ravanat et al., 2001**).

I.4.1.2. Radiation ionisantes

Un rayonnement ionisant (rayons x et rayons γ) est une particule ou une onde électromagnétique dont l'énergie est suffisante pour arracher un électron à un atome ou à une molécule, et donnent naissance à des ions et des radicaux libres (**Naoko et Sadao, 1995 ; Klanner et al., 2013**), Entraînant des dommages, directs ou indirects à l'ADN, provoquant des cassures double brin ; des lésions létales car elles touchent les fonctions vitales de la cellule (**Figure 08**) (**Frankenberg-Schwager, 1990**).

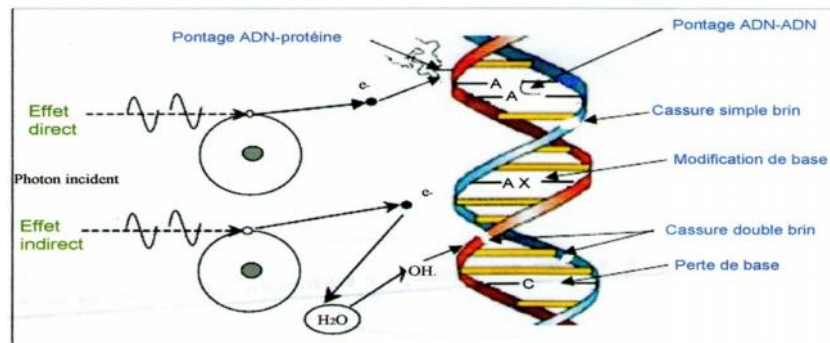


Figure 08: Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants (Prouillac, 2006).

I.4.2. Agents chimiques :

I.4.2.1. Les analogues de bases

Il s'agit des molécules qui ressemblent par leurs structures aux bases azotées ordinaires, mais qui affichent des propriétés légèrement différentes en ce qui concerne l'appariement des bases. Ces produits exigent des conditions d'utilisation précises et ne sont bien efficaces que sur des cellules en multiplication (Stanislav *et al.*, 2007). L'exemple le plus courant est celui de 5- bromouracile analogue de la Thymine, il provoque des transitions de AT en GC. (Ebrahimi *et al.*, 2013).

I.4.2.2. Les agents alkylants

Ce sont des réactifs capables d'entraîner des méthylation, ethylation ou alkylation supérieures au niveau des bases azotées mais aussi à celui des groupements phosphates. Ce sont des composés fortement électrophiles qui vont réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles, ils sont actifs sur l'ADN au repos. L'alkylation s'effectue en N ou O avec une efficacité variable selon la base et la position (Masanori et kazuyuki, 1992). Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines, la fixation de ces molécules à l'ADN empêche la réplication et la transcription 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 (Barbara *et al.*, 1996).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.4.2.3. Les agents intercalants :

Les agents intercalants sont des molécules caractéristiques, constituées de plusieurs noyaux aromatiques accolés. Cette morphologie plane leur permet de s'insérer au cœur de la double hélice de l'ADN, entre deux plans de paires de bases successifs. La distorsion ainsi créée perturbe la progression normale des systèmes enzymatiques, inhibant de ce fait la réplication et la transcription, ils sont également responsables de coupures mono et bi-caténares de l'ADN, suivant le type d'intercalant, ce phénomène provient de leur capacité, soit à générer des radicaux libres, soit à inhiber l'action des topoisomérases indispensables à la transcription de l'ADN (**Champoux, 2001**).

I.4.2.4. Les agents de transformation des bases :

L'acide nitreux, un acide faible instable qui est utilisé en synthèse organique, agit sur l'ADN en repos et provoque des mutations ponctuelles, mais également des mutations inactivantes (**Arnaud *et al.*, 1991**). L'acide nitreux désamine l'adénine en hypoxantine, la cytosine en uracile et la guanine en xanthine, ce qui crée des transitions de AT en GC et probablement quelques transversions (**Kruch, 1982**).

I.4.2.5. Azide de sodium

C'est une substance chimique de formule (NaN_3), elle produit généralement des mutations de type substitution de paires de bases, en particulier GC en AT, qui se traduit par des changements en acides aminés modifiant ainsi la fonction des protéines des mutants produits (**Salamone, 1994**). Il peut produire plusieurs autres actions en raison des mécanismes directs ou indirectes dues à ses substances toxiques produites. Le mécanisme direct peut être lié à l'inhibition de l'oxydation des enzymes comme les catalases et les cytochromes et forme un fort complexe avec l'hémoglobine qui bloque le transport de l'oxygène dans le sang, ainsi il provoque une cytotoxicité dans plusieurs systèmes d'essai animaux et de plantes, par l'inhibition de la synthèse des protéines et de l'ADN répliatif (**Arenaz et Nilan, 1981; Fahad *et al.*, 2011**). D'autres part, l'azoture de sodium a d'excellentes propriétés biocides et il est utilisé comme agent de conservation (en faible concentration) dans certaines solutions d'analyse et fluides biologiques, dont les réactifs de tests diagnostics (laboratoires médicaux) ; les échantillons de sérum, d'anticorps, ou autres solutions étalons de matériels biologiques (laboratoires médicaux et de recherche particulièrement en immunologie).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Il peut aussi être utilisé en biotechnologie, en recherche ou en industrie dans les solutions d'entreposage des membranes d'ultrafiltration et de dialyse (Ragunathan et panneersel, 2007).

L'ensemble de ces agents mutagènes (agents physiques et chimiques) et la diversité de leurs mécanismes d'actions induisent de multiples dommages, mutations et lésions au niveau de l'ADN.

I.5. Les type de dommages de l'ADN induites par les substances mutagènes :

Les lésions de l'ADN sont classées par catégories de dommages, les lésions primaires, représentant le premier stade suivant l'action d'un agent génotoxique. Ces lésions correspondent aux adduits de l'ADN, aux pontages et aux cassures simple brin. Ensuite, les mutations géniques telles que les additions, les délétions ou substitutions de bases induites par les composés mutagènes. La dernière catégorie rassemble les dommages ou mutation chromosomiques dites qualitatives ; qui vont modifier les chromosomes dans leur structure par des cassures double brin, des réarrangements ou des translocations, ces effets sont dits clastogènes contrairement aux effets aneugènes induisant des erreurs de répartition de chromosomes entiers lors des divisions (Fornace et Kohn, 1976; Schlegel *et al.*, 1986 Orsière *et al.*, 2005). Les différents types des effets des agents mutagènes sont résumés dans le schéma suivant :

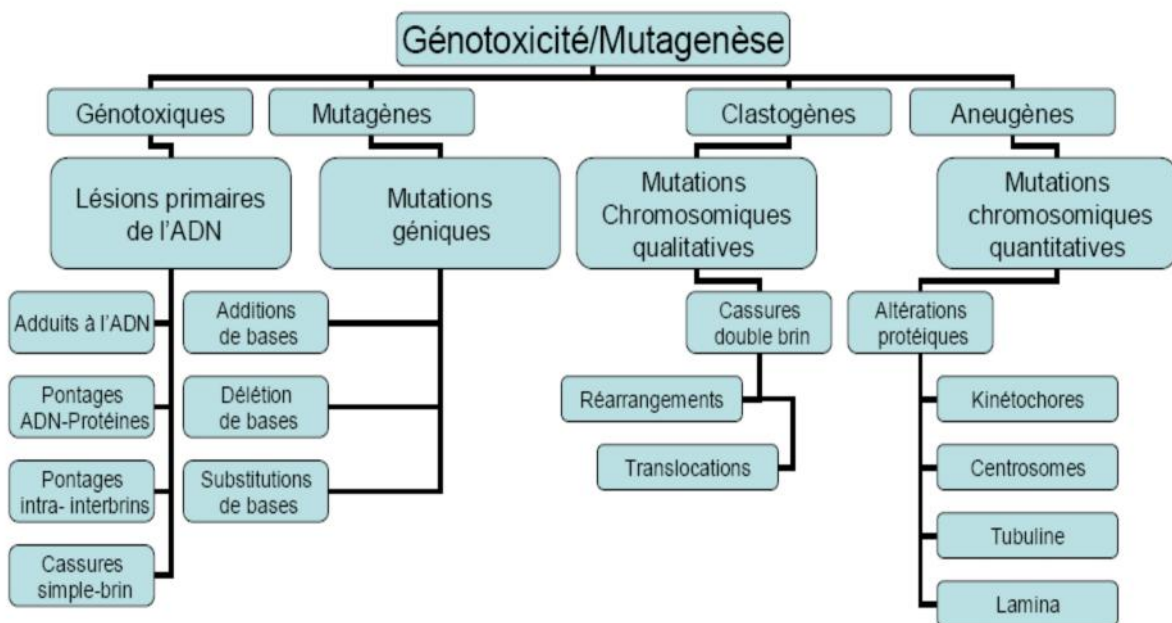


Figure 09 : Diversité des altérations de l'ADN (Lésions et mutations) (Orsière *et al.*, 2005).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Dans le but d'évaluer le potentiel génotoxique d'une substance chimique, les chercheurs ont développée plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* réalisables sur différentes espèces procaryotes et eucaryotes.

I.6. Tests de génotoxicité

Le pouvoir génotoxique d'une substance correspond à sa capacité à altérer le matériel génétique d'une cellule en se fixant de manière covalente à l'ADN, en produisant des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent générer des dommages au niveau de l'ADN ; en entraînant soit des anomalies de structures, et on parle alors de mutations chromosomiques, soit des anomalies de nombres, ce sont les mutations génomiques ou encore en inhibant les systèmes de réparation (**Toyokuni *et al.*, 1997; Fernandes *et al.*, 2013**).

Les tests de génotoxicité et de mutagénicité ont pour but de mettre en évidence l'induction de modifications (dommages à l'ADN, mutations, transformations cellulaires...etc) considérées comme plus ou moins prédictives d'un potentiel mutagène et donc cancérigène (**Hartmann *et al.*, 2004**).

Les tests les plus fréquemment utilisés sont les tests de Ames ; les tests des comètes ; des micronoyaux ; et le test des aberrations chromosomiques.

I.6.1. Test de Ames :

Le test de Ames est un test de mutagenèse proprement dite. Il consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernants, la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ reversent spontanément vers His⁺ et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut être augmentée en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Ainsi, le test de Ames consiste à compter le nombre de colonies ayant poussé sans histidine suite à l'incubation avec des agents mutagènes (**Mortelmans et Zeiger, 2000 ; Kirkland *et al.*, 2011**).

Le succès du test de Ames vient de sa simplicité d'exécution et de son coût modique. De plus, ce test est rapide (48H) et sensible. Il donne une réponse quantitative permettant des études comparatives, ce qui a permis son utilisation par de nombreux laboratoires.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Cependant, le test de Ames est un test bactérien dont le métabolisme, les systèmes de réparation de l'ADN sont différents des cellules animales et humaines (**Roshni et Dawande, 2010; Yan et al., 2012**).

I.6.2. Test de comète :

Test des comètes est une méthode simple, économique, et sensible, permet de détecter les cassures simple et doubles brins au niveau de l'ADN, ainsi que les sites abasiques instables en milieu alcalin (**Dhawan et al., 2009 ; Liman, 2013**). Le principe de cette technique consiste à suspendre des cellules dans un gel d'agarose sur une lame de microscope, puis après une étape de lyse cellulaire et la libération des noyaux, ces derniers vont migrer dans un champ électrophorétique. L'ADN endommagé chargé négativement va migrer vers le pôle positif du champ d'électrophorèse ; et si l'ADN n'a pas été endommagé il migre de façon homogène sous forme d'une sphère compacte après révélation de l'ADN par le bromure d'ethidium fluorescent (**Collin, 2004; Carla et al., 2006**).

I.6.3. Test de micronoyaux :

Le test MN est basé sur le comptage de micronoyaux pour 1000 cellules de la culture cellulaire traitée par la substance à tester pour son pouvoir génotoxique. Outre la détection de micronoyaux, ce test permet aussi la détection d'autres types d'aberrations nucléaires indiquant des dysfonctionnements cellulaires : les cellules binucléées sont dues au blocage de la cytodierèse ou à la fusion cellulaire. Le test est maintenant reconnu comme l'un des essais les plus réussis et les plus fiables pour les substances cancérogènes génotoxiques et dans le dépistage toxicologique pour les composés génotoxiques (**Szabad et al., 1983; Guérard et al., 2012**). Ce test permet aussi de détecté des cellules apoptotique (**Izquierdo et al., 2003**). Il existe deux versions majeures de ce test, l'une *in vivo* et l'autre *in vitro* (**Carita et Marin, 2003**).

I.6.4. Test des aberrations chromosomiques

Le test des aberrations chromosomiques consiste à examiner au microscope optique et déceler des anomalies telles que des cassures de chromosomes avec ou sans délétion, des modifications de structures et d'appariements, des erreurs survenues en cours de mitose (échanges entre chromatides soeurs...). Cet examen se fait au cours de la métaphase de la mitose (**Bonassi et al., 1995 ; Hagmar et al., 1998**).

I.6.5. Test de *Allium cepa*

Le test *Allium cepa* connu depuis l'année 1930 et plus tard, 1985 normalisé par Fiskesjo (**Rank et Nielsen, 1997**). Ce test est utilisé pour l'étude des effets des substances toxiques sur les chromosomes et la division cellulaire des cellules méristématiques des racines de l'oignon (**Gracieli et al., 2010**). Les bulbes de ce dernier sont faciles à stocker et à manipuler, mais aussi des paramètres macroscopiques et microscopiques peuvent être observés facilement. De plus ce système est bien corrélé avec les données obtenues à partir des systèmes eucaryotes et procaryotes, et même des dommages chromosomiques spontanés se produisent rarement (**Liman et al., 2010**).

Les auteurs décrivent *Allium cepa* comme un moyen efficace utilisé pour le dépistage et le suivi des polluants environnementaux (**Breu, 1996; Feretti et al., 2007**) car les chromosomes des plantes sont faciles à analyser en termes de taille, la morphologie et le nombre, et répondent aux traitements avec des toxines d'une manière similaire aux mammifères et d'autres eucaryotes (**Dilek et al., 2013**). En outre ce système présente d'autres avantages, il s'agit d'une méthode rapide et peu coûteuse, facile à manipuler et fournit des résultats fiables (**Grant, 1982**). Le test *Allium cepa* permet l'évaluation des paramètres génétiques suivants :

❖ Indice mitotique (IM)

L'indice mitotique correspond au pourcentage de cellules cancéreuses en train de se diviser, en phase de mitose (cycle cellulaire). Utilisé autant que paramètre à évaluer la génotoxicité de plusieurs agents. Un indice mitotique élevé indique une forte proportion de cellules en mitose, ce qui signifie que la tumeur prolifère activement et la formation de tissus tumoraux.

Dans le test *Allium cepa*, la diminution de l'IM des cellules méristématiques est considérée comme méthode fiable pour déterminer la présence d'un agent génotoxique dans le milieu (**Haywood et al., 2012**).

❖ Aberrations chromosomiques (AC) :

Les aberrations chromosomiques (AC), correspondent aux déstabilisations du génome cellulaire au cours de la division cellulaire (mitose). Cette instabilité chromosomique produite de façon spontanée ou induite par des agents physiques ou chimiques (**Leme et al., 2009**), permet la formation des aberrations chromosomiques qui peuvent être soit de nombre ou de structure (**Jha et al., 2009 ;Sifa, 2012**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Le test *A. cepa* a pour but d'évaluer les anomalies chromosomiques dont plusieurs types (ponts, chromosome fragmenté, c-mitose...) sont pris en compte et ce dans différentes phases de la division cellulaire (**Tartar et al., 2006 ; Haywood et al., 2012**).

❖ Micronoyau (MN)

L'exposition à certains agents génotoxiques peut induire des cassures chromosomiques ou un dysfonctionnement du fuseau mitotique, qui est normalement impliqué dans la répartition du matériel génétique de la cellule mère, de façon égale entre les deux cellules filles, au moment de la transition entre la métaphase et l'anaphase de la mitose. Ce dysfonctionnement ou la perte d'un fragment de chromosome entraînent la formation des micronoyaux (**Yi et al., 2007**).

Les MN ont été considérées comme le critère efficace pour analyser les effets mutagènes de différentes substances. En raison que les MN dans les cellules parentales, étant facile à observer dans les cellules filles comme une structure similaire au principale noyau, mais avec une taille réduite (**Sifa, 2008 ; Hoshina et maria, 2009**).

Tout ce repose sur les matériels génétiques alors un changement au niveau de ce dernier causera un changement radical des fonctions de l'organisme, les dommages de l'ADN sont multiples comme : cassures, pont, mauvaise ségrégation, micronoyaux et beaucoup d'autre, les plantes médicinales semblent avoir un espoir de réparation de ces dommages, pour ceci plusieurs études on été faites sur plusieurs espèces végétales dont le but d'évaluer leurs effet thérapeutique : antioxydant, anti cancer, anti inflammatoire, antigénotoxique ...etc.

Fraxinus angustifolia est parmi les plantes médicinales qui représente plusieurs vertus thérapeutiques, plusieurs auteurs sont intéressés à cette espèce (**Wallander et al., 2008 ; Calis et al., 1993**), *Fraxinus angustifolia* semble avoir des principes actifs très prometteurs décrit auparavant, d'où l'étude de l'activité antigénotoxique mais avants l'utilisation clinique une étude génotoxique est très importante.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. Matériels et Méthodes :

II.1. Matériels :

II.1.1. Matériel végétal :

II .1.1.1 *Fraxinus angustifolia* :

Cette étude est portée sur les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Ces parties de plantes sont utilisées en médecine traditionnelle notamment, dans le traitement de la constipation, la cystite, hydropisie, la goutte, l'arthrite et les douleurs rhumatismales (Do, 1972). Les feuilles prennent une longueur entre 15 à 25 cm, glabre de 5 à 13 folioles (Figure 10a). L'écorce est de couleur grise profondément cannelé à un âge plus avancé (Figure 10b).



Figure 10: Photographies des feuilles (a) et de l'écorce (b) de *Fraxinus angustifolia*.

Dans l'année 2008, **Wallander** avait classifié *Fraxinus angustifolia* comme suit :

Règne : Plantea

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Famille : Oleaceae

Genre : Fraxinus

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1.1.2 *Allium cepa* :

Les bulbes d'oignons utilisés dans cette étude sont de variété *Allium cepa* obtenus du marché d'EDIMCO de Bejaïa, ils sont d'un diamètre de 3 à 7 cm et d'un poids moyen de 25 g.

Breu en 1996 et **Shrestha** en 2004 avaient classifié *Allium cepa* comme suit :

Règne : Plantea

Division : Angiospermae

Sous divisions : Spermatophyta

Classe : Monocotyledoneae

Sous classe : Liliidae

Ordre : Liliaceae

Famille : Alliaceae

Genre : *Allium*

Espèce : *Allium cepa* L.

II.1.2. Produits chimiques :

Sulfate de calcium de PROLABO (CaSO_4), sulfate de magnésium anhydre de SCHARLAU (MgSO_4), bicarbonate de sodium de PROLABO (NaHCO_3), chlorure de potassium (KCl) , Carmin acétique (Sigma), acide acétique d'ORGANICS ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), chlorure d'hydrogène (HCl), Diméthylsulfoxyde de PROLABO (DMSO), azide de sodium de BIOCHEM Chemopharma (NaN_3), Ethanol de PROLABO ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$).

II.1.3. Equipement et matériels de laboratoire :

Microscope optique (ZEISS) à grossissement (X10, X40, X100) et loupe binoculaire à grossissement (X0,8), Centrifugeuse (SIGMA), Bain marie (MEMMET), Etuve (ECOCELL), Balance de précision 0,01g (RADWAG), Agitateur (VELP), Sonicateur (RAYPA), Vortex(VELP).

*Lames, lamelles, tubes à essais, micropipettes, pipettes, éprouvettes, poires, béchers, Eppendorfs, barreaux magnétiques, spatules, pinces, seringues, erlenmeyers.

II.2. Méthodes :

II.2.1. Préparation des échantillons de *Fraxinus angustifolia* :

Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en juillet 2013 à Chemini (wilaya de Bejaia), puis séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière vive. Le matériel végétal sec a été réduit en poudre par broyage, suivi d'un tamisage jusqu'à l'obtention de poudres très fines (diamètre inférieur à 63 μ m).

II.2.2. Extraction :

Les poudres fines de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été macérées dans l'éthanol (95%) avec un rapport de 1:4/p:v, sous agitation. Ensuite, le mélange a été laissé décanté pendant 12H, puis le surnageant a été centrifugé (1500g/10 min) afin de le débarrasser de toute trace de poudre. L'extrait obtenu a été séché à température ambiante et à l'abri de la lumière vive. Après évaporation totale, la pesée de l'extrait sec a été prise jusqu'à stabilisation de son poids. L'objectif de cette extraction est d'obtenir le maximum de composés contenus dans les poudres des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

II.2.3. Test de génotoxicité :

Allium cepa est l'espèce la plus fréquemment utilisée dans les tests d'évaluation des aberrations chromosomiques (**Grant et Salamone, 1994**), ceci pour plusieurs avantages notamment sa manipulation rapide, simple et facile car ses racines prennent un intervalle de 18H à 24H pour atteindre une taille de 1 à 1,5cm et son efficacité dans les tests de génotoxicité a été démontrée dans plusieurs travaux scientifiques dans le monde entier (**Akimboro et Bakare, 2007 ; Saghrirzadeh et al., 2008 ; Gracieli et al., 2010**). De plus les chromosomes de *A. cepa* sont de tailles importantes à nombre réduit (2n=16) (**Fiskesjo, 1994**), ce qui facilite la visualisation des différentes étapes de divisions cellulaires ainsi que les aberrations chromosomiques (**Rank et Nielsen., 1997**), sans oublier sa sensibilité aux mutagènes (**Doll et Peto, 1981**).

Chapitre II : Matériels et méthodes

*Traitement des bulbes d'oignons :

Les bulbes d'oignons ont été bien lavés et nettoyés surtout débarrassés des racines anciennes, puis ils ont été immergés dans des flacons de culture de 50ml remplis d'un milieu de culture (**Figure 11a**) composé de: 60mg/L de CaSO₄, 60mg/L de MgSO₄, 96mg/L de Na HCO₃ et 4mg/L de KCl.

Les flacons ont été placés dans une étuve à 25°C (**Figure 11b**) jusqu' à ce que les racines atteignent la taille de 1 à 1,5 cm. Les bulbes d'oignons sélectionnés sont repartis en lots de cinq bulbes chacun pour recevoir les différents traitements, représentés dans le **tableau III**.



Figure 11 : Photographies de *Allium cepa* immergé dans le milieu de culture (a), et incubé dans l'étuve (b).

Chapitre II : Matériels et méthodes

Tableau III : Tableau récapitulatif des traitements de bulbes de *A. cepa*.

lot	Traitement
Témoin négatif : Eau distillée	Milieu de culture + Eau distillée
Témoin négatif : DMSO	Milieu de culture + 2ml de DMSO
Témoin positif : Azide de sodium (AS) (NaN₃)	Milieu de culture+ <ul style="list-style-type: none"> azide de sodium 25mg/1 (AS) azide de sodium 50mg/1 (AS) azide de sodium 100mg/1 (AS)
Test de génotoxicité : Extrait de feuilles (EF)	Milieu de culture + <ul style="list-style-type: none"> Extrait de feuilles 50mg/1 (EF) Extrait de feuilles 100mg/1 (EF) Extrait de feuilles 300mg/1 (EF) Extrait de feuilles 500mg/1 (EF)
Test de génotoxicité : Extrait d'écorce (EE)	Milieu de culture + <ul style="list-style-type: none"> Extrait d'écorce 50mg/1 (EE) Extrait d'écorce 100mg/1 (EE) Extrait d'écorce 300mg/1 (EE) Extrait d'écorce 500mg/1 (EE)
Teste d'antigénotoxicité : Extrait de feuilles (EF) + azide de sodium(AS)	Milieu de culture+ <ul style="list-style-type: none"> EF (50) mg/1+ AS 100mg/1 EF (100) mg/1 + AS 100mg/1
Test d'antigénotoxicité : Extrait d'écorce (EE) +azide de sodium (AS)	Milieu de culture + <ul style="list-style-type: none"> EE (50) mg/1 + AS 100mg/1 EE (100) mg/1 + AS 100mg/1

Chapitre II : Matériels et méthodes

Les cinq bulbes d'oignons de chaque lot ont été divisés en quatre compartiments contenant cinq à sept racines. Ces dernières ont été mesurées à $t_0=0H$, ensuite mesurées et prélevées à $t_1=18H$, $t_2=24H$, $t_3=48H$ et $t_4=72H$ (**Figure 12a**). À chaque prélèvement les racines seront fixées dans une solution fixatrice constituée d'acide acétique et d'éthanol (1 :3/v :v) pendant 24H. Les racines non traitées ont été stockées dans une solution d'éthanol (70%) (**Figure 12b**).



Figure 12 : Photographies de la mesure de la longueur des racines (a) et de leurs stockages dans l'éthanol (70%) (b).

***Traitement et observation des racines :**

Les racines de chaque prélèvement ont été lavées trois fois par l'eau distillée et traitées dans un premier temps par une solution HCl (1N) et incubé dans un bain marie (10minutes à $60^{\circ}C$), dans le but d'hydrolyser la paroi cellulosique. Les racines ont été ensuite lavées trois fois, puis traitées par une solution colorante de carmin acétique (1% dans d'une solution d'acide acétique 45%) pour 10 minutes dans le bain marie, afin de colorer les chromosomes. Les extrémités méristématiques terminales des racines colorées ont été coupées à l'aide d'une seringue sous une loupe optique (X0,8), puis écrasées entre lames et lamelles pour bien visualiser les chromosomes et les différentes étapes des divisions cellulaires.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.2.4. Examen microscopique :

L'analyse microscopique du méristème des racines de chaque bulbe a été réalisée suivant la méthode de **Yildiz *et al.*, (2008)** et **Mesi *et al.*, (2013)**. Elle consiste à dénombrer environ 1000 cellules par échantillon, en prenant en considération les différents stades de division cellulaire pour calculer l'indice mitotique (IM) de chaque bulbe examiné, par la formule suivante :

$$IM(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules en mitose}}{\text{Total des cellules dénombrées}} * 100$$

Dans cette analyse, les aberrations chromosomiques à savoir les cassures et les mauvaises ségrégations, ainsi que les micronoyaux ont été pris en considération (**Rank et Nielsen, 1997; Yildiz *et al.*, 2008**) et le taux des cellules aberrantes est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux des aberrations} = \frac{\text{Nombre de cellules aberrantes}}{\text{Total des cellules dénombrées}} * 100$$

II.2.5. Analyse statistique :

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne \pm S.E.M. L'étude statistique a été réalisée par l'analyse de la variance ANOVA one way du logiciel GraphPad Prism version 5.3, avec Dunett's post-test. Les valeurs sont considérées statistiquement significative à $P < 0,05$.

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Résultats :

III.1.1 Résultats de l'extraction :

Le but de l'extraction éthanolique est d'obtenir un maximum de composés actifs, particulièrement phénoliques. Le rendement en extraits éthanoliques secs est de 12% à partir des feuilles et 5% à partir de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Chaque extrait est caractérisé par sa couleur et son rendement par rapport à la matière sèche.

III.1.2. Résultats de l'observation macroscopique et mesure de la longueur des racines :

Les racines de *Allium cepa* traitées avec l'eau distillée et le DMSO n'ont marqué aucun changement morphologique, par contre celles traitées avec l'azide de sodium (AS), notamment à 100mg/L, ont montré un rétrécissement et une rigidité remarquable. Tandis que les racines de *Allium cepa* traitées avec les extraits de feuilles (EF) et de l'écorce (EE) de *Fraxinus angustifolia* ont montré à leur tour un changement dépendant des concentrations appliquées. A 50mg/L et 100mg/L un faible changement de couleur et la tenue de leur structure droite, alors qu'à 300mg/L et 500mg/L elles ont été teintées à la couleur des extraits et ont aussi montré une rigidité remarquable (**Figure 13, Tableau IV**).

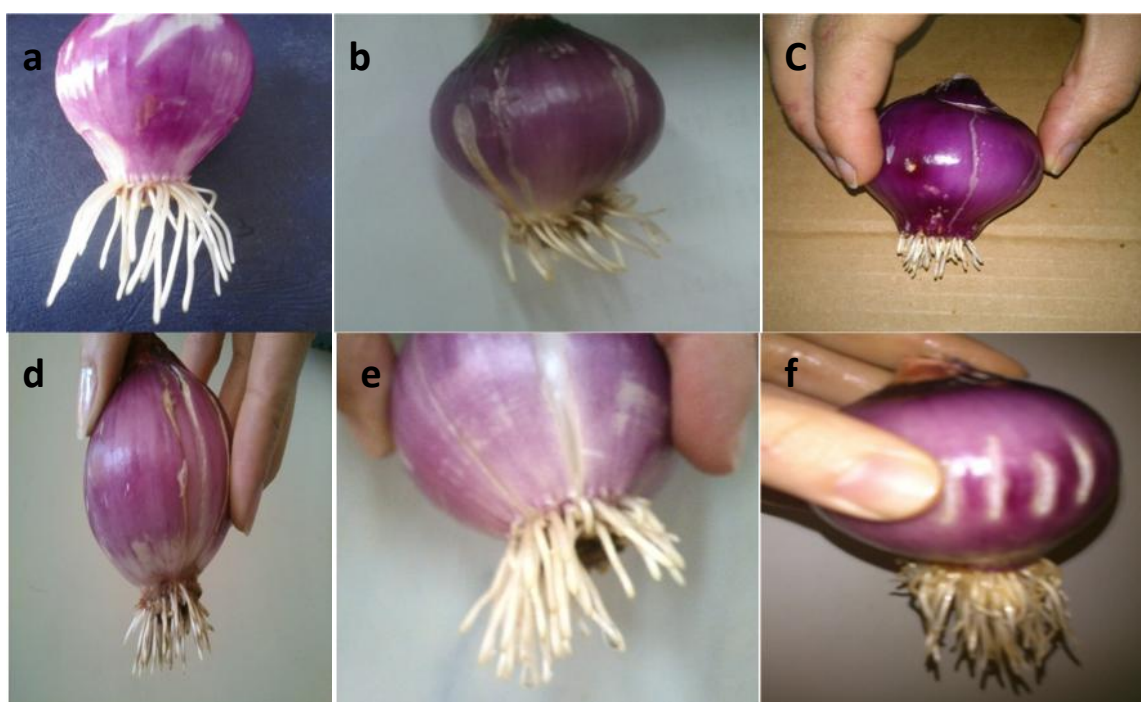


Figure 13 : Photographies des aspects des racines de *Allium cepa* dans les différents traitements :

(a) L'eau distillée ; (b) AS (100mg/L) ; (c) EF (50mg/L) ; (d) EF (500mg/L) ; (e) EE (50mg/L); (f) EE500mg/L.

Chapitre III. Résultats et discussion

Tableau IV : Résultats des mesures de la croissance des racines de *Allium cepa*.

Traitements	L (cm)			
	18H	24H	48H	72H
Eau distillée	0.39±0.15	0.44±0.07	0.59±0.09	0.91±0.12
DMSO	0.35±0.17	0.39±0.18	0.71±0.22	0.9±0.15
AS 25mg/L	0.18±0.07	0.10±0.02**	0.17±0.07**	0.14±0.03***
AS 50mg/L	0.14±0.01	0.09±0.08**	0.15±0.07**	0.11±0.11***
AS 100mg/L	0.17±0.05	0.08±0.09**	0.08±0.08***	0.04±0.06***
EE 50mg/L	0.48±0.07	0.44±0.06	0.41±0.06	0.41±0.11###
EE 100mg/L	0.46±0.02	0.45±0.05	0.40±0.09	0.38±0.08###
EE 300mg/L	0.43±0.01	0.39±0.03	0.32±0.07#	0.31±0.03###
EE 500mg/L	0.41±0.03	0.38±0.07	0.29±0.06#	0.21±0.05###
EF 50mg/L	0.51±0.01	0.50±0.02#	0.49±0.05	0.46±0.04##
EF 100mg/L	0.49±0.07	0.46±0.04	0.44±0.13	0.40±0.05###
EF 300mg/L	0.44±0.05	0.43±0.05	0.41±0.05	0.39±0.03###
EF 500mg/L	0.41±0.04	0.38±0.04	0.35±0.04	0.31±0.08###
AS+ EE 50mg/L	0.17±0.05	0.19±0.07	0.24±0.10	0.25±0.08
AS+ EE 100mg/L	0.22±0.08	0.23±0.09	0.27±0.11	0.31±0.13
AS+ EF 50mg/L	0.15±0.03	0.22±0.05 [£]	0.22±0.08 [£]	0.24±0.03 [£]
AS+ EF100mg/L	0.19±0.01	0.19±0.02 [£]	0.22±0.04 [£]	0.26±0.07 [£]

*Comparaison avec le contrôle négatif eau distillée.

#Comparaison avec le contrôle négatif DMSO.

£Comparaison avec l'azide de sodium 100mg/L.

D'après les résultats du tableau ci-dessus, le taux de croissance des racines de *Allium cepa* est non significatif lors de la comparaison entre le contrôle négatif le DMSO à l'eau distillée, pour les quatre intervalles de temps (18H, 24H, 48H et 72H). Les lots traités avec l'azide de sodium (25mg/L, 50mg/L et 100mg/L) sont non significatifs à 18H, l'azide de sodium (25mg/L, 50mg/L) sont significatifs à 24H et 48H, hautement significatifs à 72H. L'azide de sodium à concentration 100mg/L est significatifs à 24H et hautement significatif à 48H et 72H.

Le taux de croissance des racines de *Allium cepa* traitées avec l'extrait de l'écorce de *F. angustifolia* (50mg/L, 100mg/L, 300mg/L et 500mg/L) sont non significatifs ($P < 0,05$) à 18H et 24H, alors que l'EE (50mg/L et 100mg/L) sont non significatifs à 48H et hautement

Chapitre III. Résultats et discussion

significatifs à 72H. Pour les deux concentrations 300mg/L et 500mg/L, le taux de croissance est moins significatif à 48H et hautement significatif à 72H.

L'analyse statistique de taux de croissance des racines de *Allium cepa* traitées avec l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* (50mg/L, 100mg/L, 300mg/L et 500mg/L) sont non significatifs à 18H et 48H, hautement significatifs à 72H, à 24H l'EF (50mg/L) est moins significatif et non significatif pour les trois concentrations (100mg/L, 300mg/L et 500mg/L). L'analyse statistique de taux de croissance des racines de *Allium cepa* est non significatifs lors du traitement combiné, azide sodium (100mg/L) avec l'extrait de l'écorce (50mg/L, 100mg/L) de *F. angustifolia* pour les différents intervalles de temps (18H, 24H, 48H et 72H). Cependant, le traitement des racines de *Allium cepa* avec l'azide de sodium et l'extrait de feuilles (50mg/L et 100mg/L) de *F. angustifolia* a montré un résultat non significatifs à 18H et moins significatifs pour les trois prélèvements (24H, 48H et 72H).

Ces résultats indiquent que la croissance des racines de *A. cepa* est normale lors du traitement avec l'eau distillée et le DMSO, par contre l'azide de sodium a montré un effet cytotoxique ce qui a conduit au rétrécissement de la longueur de ces racines notamment pour l'azide de sodium (100mg/L). Tandis que celles traitées avec les extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* ont montré une réduction de la croissance par rapport au contrôle négatifs et un peu plus importante comparativement à l'azide de sodium, ceci indique que ces extraits ont un effet moins cytotoxique par rapport à l'azide de sodium.

Cependant, le traitement combiné par les extraits de feuilles et de l'écorce (50mg/L et 100mg/L) de *F. angustifolia* avec l'azide de sodium (100mg/L) a légèrement amélioré la croissance des racines de *A. cepa*.

III.1. 3. Résultats du test d'évaluation de la génotoxicité :

Durant l'examen microscopique des cellules de *Allium cepa* obtenues après les différents traitements, les stades de division cellulaire ainsi que les différentes anomalies chromosomiques ont été repérées et dénombrées.

III.1.3.1. Résultats du traitement par l'eau distillée et le DMSO (contrôles négatifs) :

L'examen microscopique des racines de *Allium cepa* a permis de calculer l'indice mitotique des lots de bulbes contrôles négatifs (eau distillée et DMSO). Les résultats sont représentés dans l'histogramme suivant :

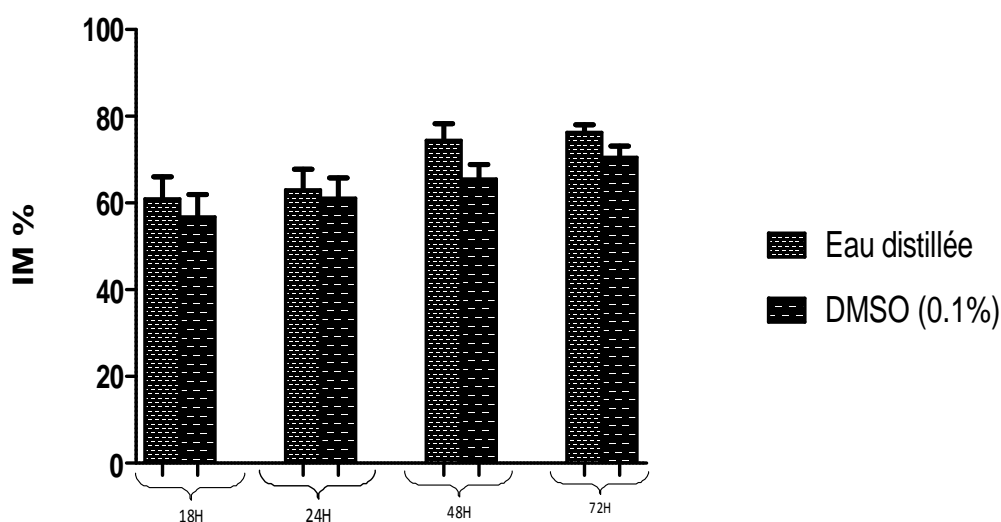


Figure 14 : Histogramme des résultats des contrôles négatifs des racines de *Allium cepa* (Eau distillée et DMSO).

Les résultats de l'analyse statistique pour les racines de *Allium cepa* traitées avec l'eau distillée et le DMSO n'ont montré aucune différence significative ($P < 0,05$), en fonction de temps (**Figure 14**) et l'aspect microscopique des différents stades de division cellulaire sont représentés dans la figure suivante :

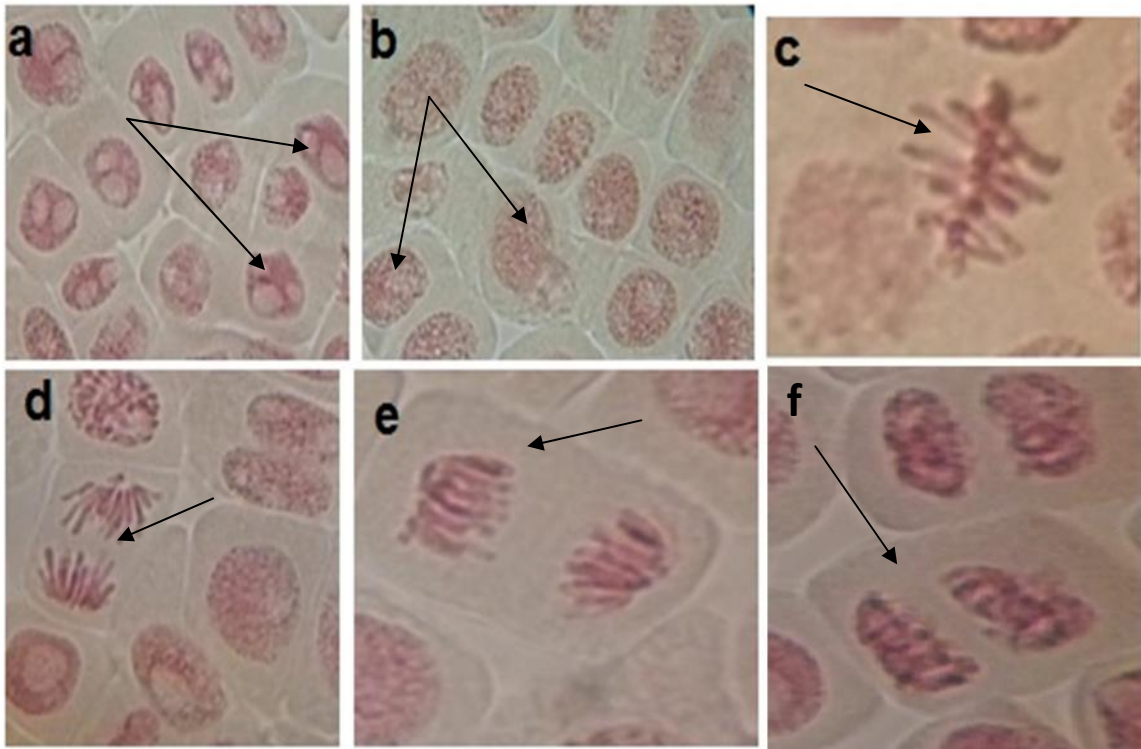


Figure 15: Photographies des divisions normales des cellules méristématiques de *Allium cepa*. (X40, X100). (a) Interphase ; (b) prophase ; (c) métaphase ; (d) anaphase; (e-f) télophase.

L'observation des cellules de *Allium cepa* sous microscope optique (X40) a permis de visualiser tous les stades d'une division cellulaire normale ; interphase, prophase, métaphase, anaphase et télophase sans aucune perturbation ni anomalies chromosomiques (**Figure15**).

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.3.2. Résultats du traitement par l'azide de sodium (Contrôle positif) :

Les résultats de l'analyse statistique de l'indice mitotique des racines traitées avec l'azide de sodium à différentes concentrations sont représentés dans l'histogramme suivant :

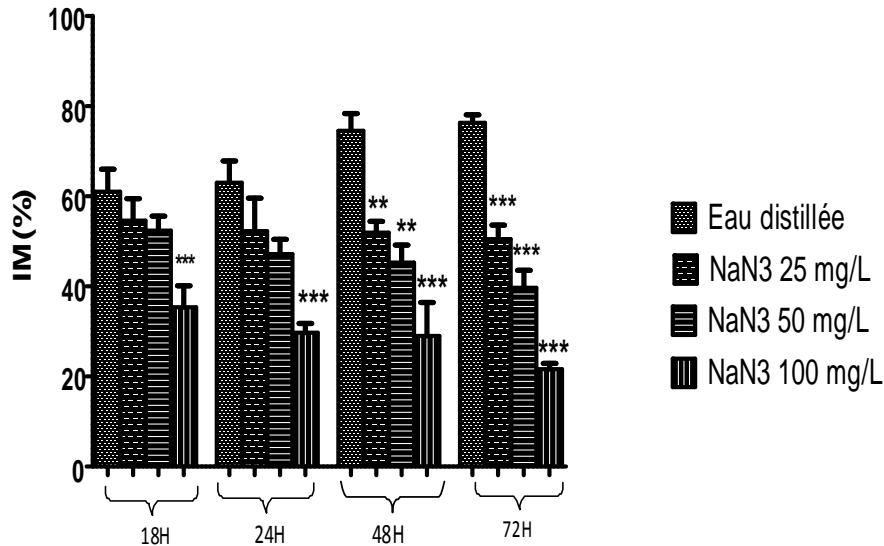


Figure 16 : Histogramme représentant les résultats de l'indice mitotique des bulbes traités par l'azide de sodium (NaN3).

L'analyse statistique comparative des indices mitotiques entre les deux lots, eau distillée et azide de sodium, est non significative pour l'azide de sodium (25mg/L) pour les deux intervalles de temps (18H et 24H), significative à 48H et hautement significative à 72H. L'azide de sodium (50mg/L) est non significatif à 18H et 24H, significatif à 48H et hautement significatif à 72H. L'azide de sodium (100mg/L) est hautement significatif pour les quatre intervalles de temps. Il est remarquable que l'azide de sodium (100mg/L) a réduit l'indice mitotique de façon très hautement significative dans les quatre intervalles de temps, ce qui veut dire que l'influence de l'azide de sodium dépend de la concentration et du temps car l'indice mitotique a diminué progressivement en fonction de ces deux paramètres.

Chapitre III. Résultats et discussion

Le traitement des racines de *Allium cepa* par les différentes concentrations d'azide de sodium a conduit à l'apparition de différentes anomalies chromosomiques et la perturbation de la division cellulaire, représenté dans la (Figure 17) :

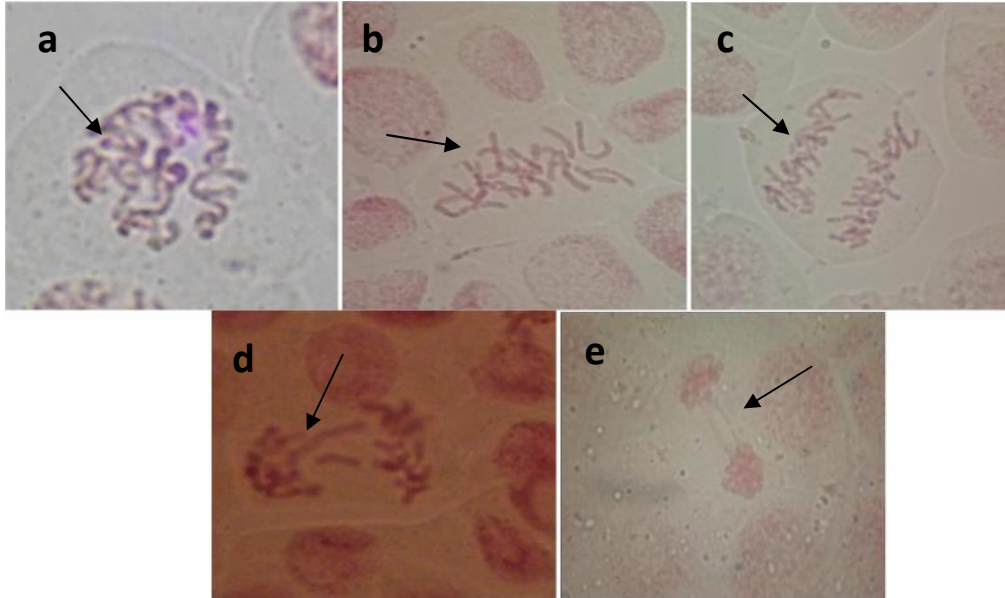


Figure 17: Photographies des anomalies chromosomiques induites par l'azide de sodium (X40 et X100) (a)C mitose; (b) métaphase perturbée ; (c) anaphase perturbée ; (d) cassure ; (e) un pont.

Les différentes anomalies chromosomiques et perturbations dans les stades de division cellulaires à savoir : C-mitose ; cassures et ponts, des métaphases et des anaphases perturbées ont été dénombrées et les pourcentages des aberrations sont calculés et représentés dans le tableau suivant :

Chapitre III. Résultats et discussion

Tableau V : les Pourcentage d'aberrations chromosomiques induites par l'azide de sodium (NaN₃).

Traitements	% des aberrations chromosomiques			
	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
	Prélèvement	Prélèvement	Prélèvement	Prélèvement
	(18H)	(24H)	(48H)	(72H)
Eau distillée	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
NaN ₃ 25mg/L	0.21±0.13	0.31±0.53	0.37±0.04	0.41±0,16
NaN ₃ 50mg/L	1.5±0.778	1.63±0.54	2.76±0.13	2,99±0.23
NaN ₃ 100mg/L	4.83±1.47**	4.64±0.74***	4.97±1.54***	5.84±2.78***

D'après les résultats obtenus, on a remarqué que le pourcentage des aberrations chromosomiques augmentent en fonction de la concentration, notamment pour l'azide de sodium 100mg/L où il est hautement significatif pour les trois intervalles de temps (24H, 48H et 72H) et significatif à 18H, avec la dominance des C-mitose pour toutes les concentrations appliquées (**Annexes N° 5, 6, 7, 8**), tandis que pour les perturbations en métaphases et anaphases sont plus élevées par rapport aux cassures et aux ponts chromosomiques. Cette dernière aberration est observée que pour l'azide de sodium (100mg/L), ceci suggère que la concentration joue un rôle important dans l'induction de ce type d'aberration (**Annexes N°5**).

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.3.3. Extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* :

Les résultats de l'IM des cellules méristématiques des racines de *Allium cepa* traitées avec les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont représenté dans la (Figure 18).

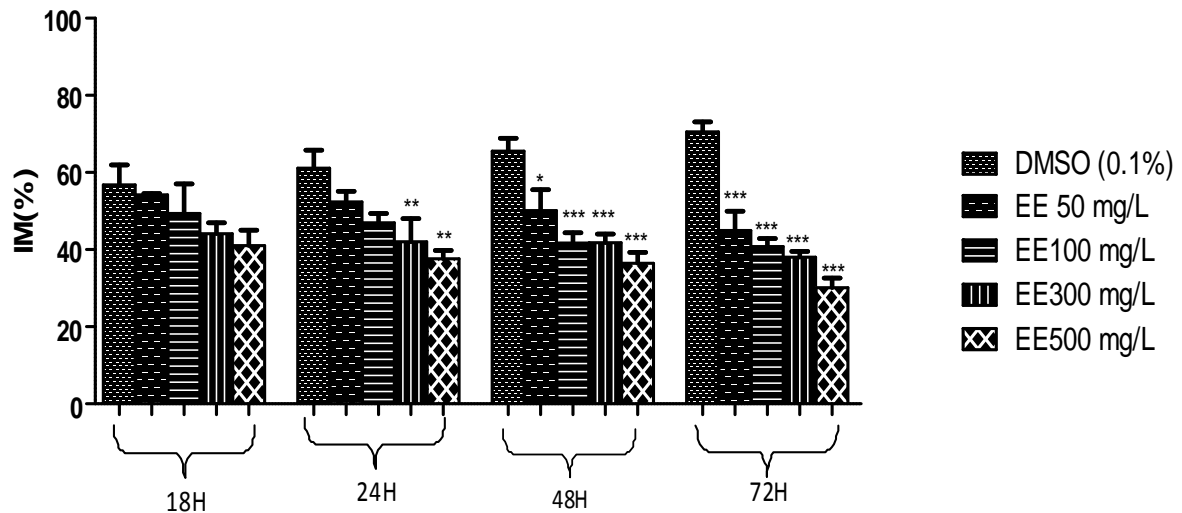


Figure 18: Histogramme des résultats de génotoxicité des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Les résultats de l'analyse statistique de l'indice mitotique comparative entre le lot du DMSO et les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont non significatifs ($P > 0,05$) à 18H et à différentes concentrations, alors qu'à 24H les deux concentrations 50mg/L et 100mg/L sont non significatifs comparativement à 300mg/L et 500mg/L. Pour le troisième prélèvement (48H), l'extrait de l'écorce (50mg/L) est moins significatif que le reste des concentrations de l'extrait de l'écorce qui sont hautement significatifs. A 72H, toutes les concentrations sont hautement significatives, ce qui indique une génotoxicité dépendante de la dose et de l'intervalle de temps de l'extrait de l'écorce.

Chapitre III. Résultats et discussion

Les lames analysées sous microscope optique des racines de *Allium cepa* traitées avec l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont montré différents types d'aberrations chromosomiques représentées dans la **Figure 19**.

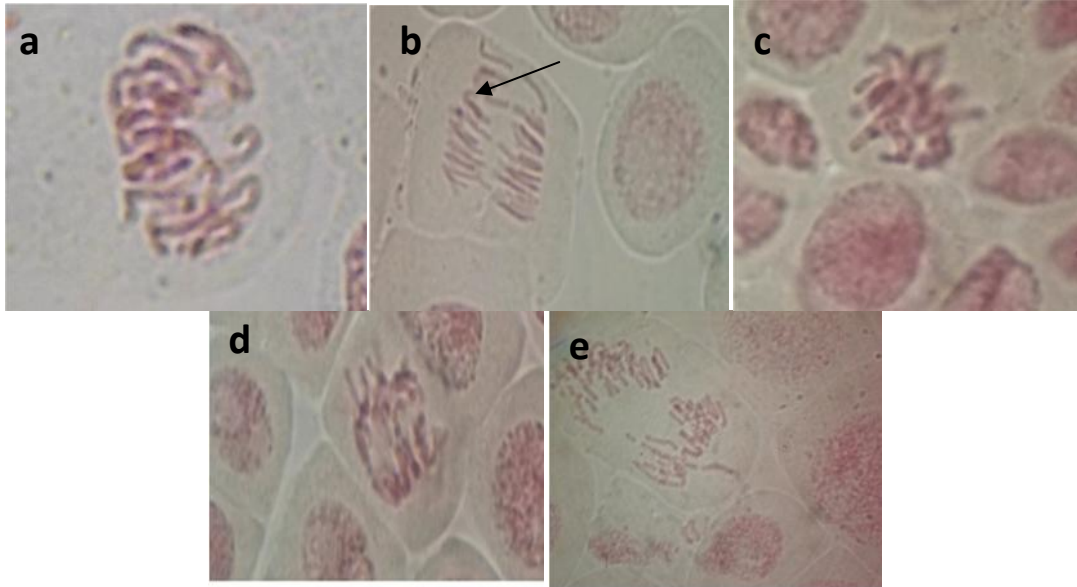


Figure 19: Photographies des anomalies causées par les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* (X40 et X100). (a) C-mitose ; (b-d) anaphase perturbée ;(c) métaphase perturbée ; (e) cassure.

L'analyse microscopique des cellules méristématiques des racines de *Allium cepa* traitées avec l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a mis en évidence des aberrations chromosomiques différentes comme les cassures, les C-mitose, les anaphases et métaphases perturbées. Les C-mitose ont marqué le pourcentage le plus élevé suivis par les métaphases perturbées, puis les anaphases anormales et les cassures (**Tableau VI; Annexes N°5, 6, 7,8**).

Chapitre III. Résultats et discussion

Tableau VI: Tableau des pourcentages des aberrations chromosomiques lors du traitement avec l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Traitements	% des aberrations chromosomiques			
	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
	Prélèvement (18H)	Prélèvement (24H)	Prélèvement (48H)	Prélèvement (72H)
Eau distillée	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
EE 50mg/L	1.19±0.08	1.15±0.45	2.13±0.6 [#]	2.33±0.47 ^{###}
EE 100mg/L	1.48±0.29	2.19±0.64 ^{##}	2.33±0.96 ^{##}	2.27±0.23 ^{###}
EE 300mg/L	2.29±0.46 ^{##}	2.49±0.37 ^{###}	2.29±0.56 [#]	2.48±0.33 ^{###}
EE 500mg/L	2.38±0.24 ^{##}	2.89±0.78 ^{###}	2.94±0,11 ^{##}	2.82±0.09 ^{###}

EE: extrait d'écorce

L'analyse statistique des pourcentages d'aberrations chromosomiques est non significative pour l'extrait de l'écorce (50mg/L) à 18H et 24H, moins significative à 48H et hautement significative à 72H. L'effet de l'EE (100mg/L) est non significatif à 18H, significatif à 24H et 48H et hautement significatif à 72H, Tandis que le pourcentage exhibé par l'EE (300mg/L) est significatif à 18H et hautement significatif à 24H et 72H et moins significatifs à 48H. L'extrait de l'écorce (500mg/L) est significatif à 18H et 48H, hautement significatif à 24H et 72H. Ce ci signifie que l'extrait d'écorce exerce un effet dépendant de la dose et de plus en plus fort avec le temps.

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.3.4. Extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia* :

L'effet des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur l'IM des cellules méristématiques de *Allium cepa* est illustré dans la figure qui suit :

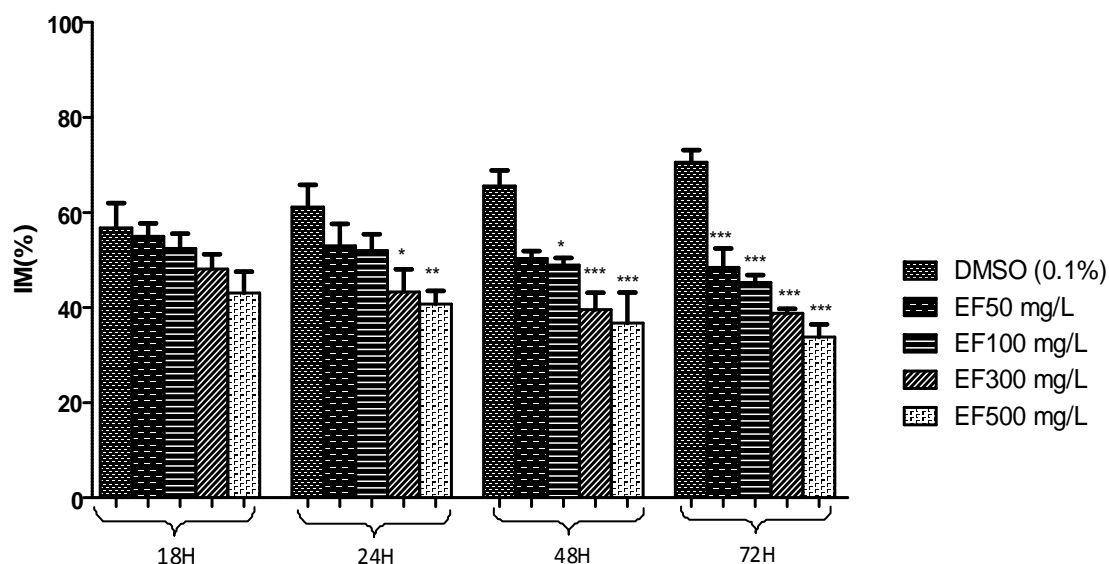


Figure 20 : Histogramme représentant les résultats de du test de génotoxicité des extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Les résultats de l'analyse statistique comparative de indice mitotique entre le DMSO et les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont comme suite : la concentration 50mg/L est non significative à 18H, 24H et 48H mais hautement significative à 72H, tandis qu'à 100mg/L, il est non significatif à 18H et 24H, moins significatifs à 48H et hautement significatif à 72H. Par ailleurs, ce même extrait à 300mg/L, a présenté un IM non significatif à 18H, moins significatif à 24H et hautement significatif à 48H et 72H.

La réduction de l'IM par la concentration la plus élevée (500mg/L) de l'EF est non significatif à 18H, significatif à 24H et hautement significatif à 48H et 72H. L'IM obtenu après traitement des racines de *Allium cepa* par l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* a marqué une diminution par rapport au DMSO, ce qui indique la présence d'un effet génotoxique dose et temps dépendant chez les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. Cette diminution de l'IM est accompagnée par l'apparition des aberrations chromosomiques : C-mitose ; anaphase et métaphase perturbées et des télophases perturbées (**Figure 21**).

Chapitre III. Résultats et discussion

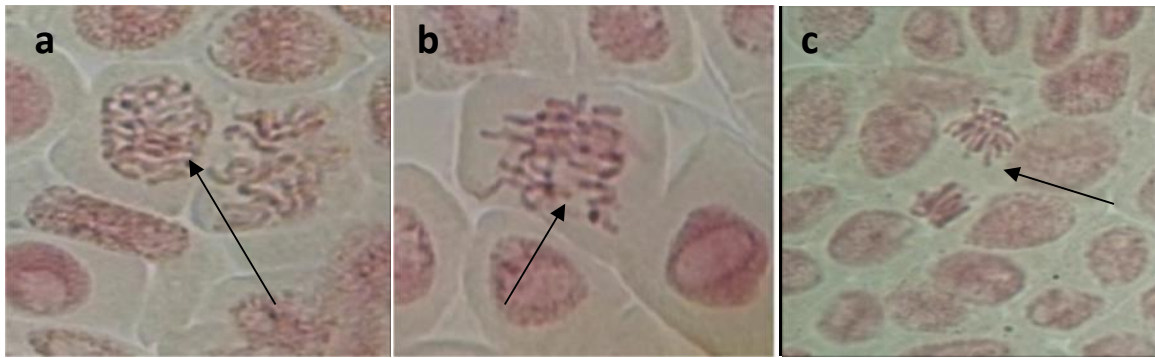


Figure 21: Photographies des anomalies chromosomiques des racines de *Allium cepa* causées par l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* (X40) (a) c-mitose ; (b) métaphase perturbée ; (c) telophase perturbée.

La division des cellules de racines de *Allium cepa* traitées par l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont montré des anomalies au niveau des chromosomes, notamment des C-mitose suivis par les métaphases perturbées (**Annexes N° 5, 6, 7, 8**) et le pourcentage des aberrations chromosomiques est représenté dans le tableau suivant :

Tableau VII : Tableau de pourcentage d'aberrations chromosomiques lors du traitement avec l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia*

Traitements	% des aberrations chromosomiques			
	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
	Prélèvement (18H)	Prélèvement (24H)	Prélèvement (48H)	Prélèvement (72H)
Eau distillée	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
EF 50mg/L	1.09±0.21	1.47±0.2	1.65±0.51	1.89±0.66 ^{##}
EF 100mg/L	1.8±0.43 [#]	1.87±0.21 [#]	1.50±0.14	1.39±0.34
EF 300mg/L	1.24±0.49	1.98±0.24 [#]	1.56±0.22	1.67±0.23 [#]
EF 500mg/L	1.9±0.83 [#]	2.49±0.12 ^{###}	2.49±0.71 [#]	2.58±0.35 ^{###}

EF : extrait de feuilles

Le pourcentage des anomalies chromosomiques induites par l'EF (50mg/L) est non significatif à 18H, 24H et 48H. Significatif à 72H. Alors que l'EF (100mg/L) est moins significatif à 18H et 24H et non significative à 48H et 72H. L'EF (300mg/L) non significatif à 18H et 48H, moins significative à 24H et 72H. Tandis que celui de l'EF (500mg/L) est moins significatif à 18H, 48H et hautement significatif à 24 et 72H. Si on compare avec les contrôles négatifs on déduit que l'extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia* a un effet mutagène sur les racines de *Allium cepa* et moins génotoxique par rapport à l'extrait d'écorce de *Fraxinus angustifolia* (**Tableau VII**).

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.4. Résultats de l'activité anti-génotoxique des extraits de *F.angustifolia* :

III.1.4.1. Traitement combiné par les extraits d'écorce et l'azide de sodium :

Le traitement combiné des bulbes de *Allium cepa* avec un mélange de l'extrait des écorces de *Fraxinus angustifolia* et l'azide de sodium a permis de mettre en évidence leurs effets anti-génotoxiques et les résultats sont montrés dans la **figure 22** :

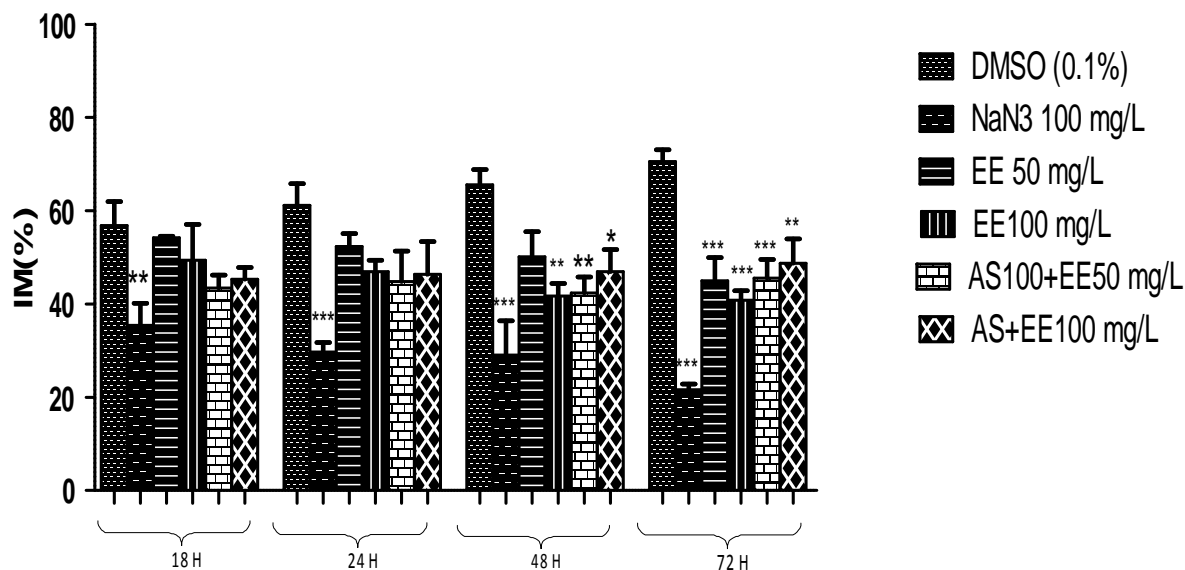


Figure 22 : Histogramme des résultats du traitement combiné par les extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et l'azide de sodium.

Après le traitement combiné des bulbes par l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et l'azide de sodium (100mg/L), les résultats indiquent que l'extrait de l'écorce a eu une action antigénotoxique car l'IM a augmenté par rapport au contrôle positif, selon la concentration et le temps. Les types d'anomalies chromosomiques trouvées dans ce test se résument en C-mitose avec des pourcentages inférieurs pour les autres aberrations (métaphases, anaphases et télophases perturbées), comparativement à l'azide de Sodium 100mg/L (**Annexes N°5, 6, 7, 8 et Figure 23**).

Chapitre III. Résultats et discussion



Figure 23: Photographies des anomalies chromosomiques causées lors du traitement anti-génotoxique des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. (a) c-mitose ;(b) métaphases perturbée ; (c) anaphase perturbée.

Le calcul des pourcentages en aberrations chromosomiques obtenues par traitement antigénotoxique est motionné dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Pourcentage d'aberrations chromosomiques lors du traitement combiné d'azide de sodium et l'extrait de l'écorce.

Traitements	% des aberrations chromosomiques			
	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
	Prélèvement (18H)	Prélèvement (24H)	Prélèvement (48H)	Prélèvement (72H)
Eau distillée	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
AS+ EE 50mg/L	3.55±0.53 ^{fff}	3.53±0.19 ^{fff}	2.07±0.07 ^{ff}	2.09±0.11 ^{fff}
AS+ EE 100mg/L	2.78±0.24 ^{fff}	1.65±0.22 ^{fff}	1.43±0.09	1.92±0.16 ^{fff}

AS : azide de sodium EE : extrait d'écorce

D'après les résultats du **tableau VIII**, le pourcentage des aberrations chromosomiques a diminué en fonction de la dose et de l'intervalle de temps. Le traitement combiné entre l'azide de sodium et l'extrait de l'écorce (50mg/L) de *Fraxinus angustifolia* est hautement significatif pour trois intervalles de temps (18H, 24H et 72H). A 100mg/L il est hautement significatif à 18H, 24H et 72H, mais non significatif à 48H.

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.4.2. Traitement combiné par les extraits de feuilles et l'azide de sodium :

Les IM des traitements combinés de l'azide de sodium et l'extrait de feuilles sont illustrés dans la **figure 24** qui suit :

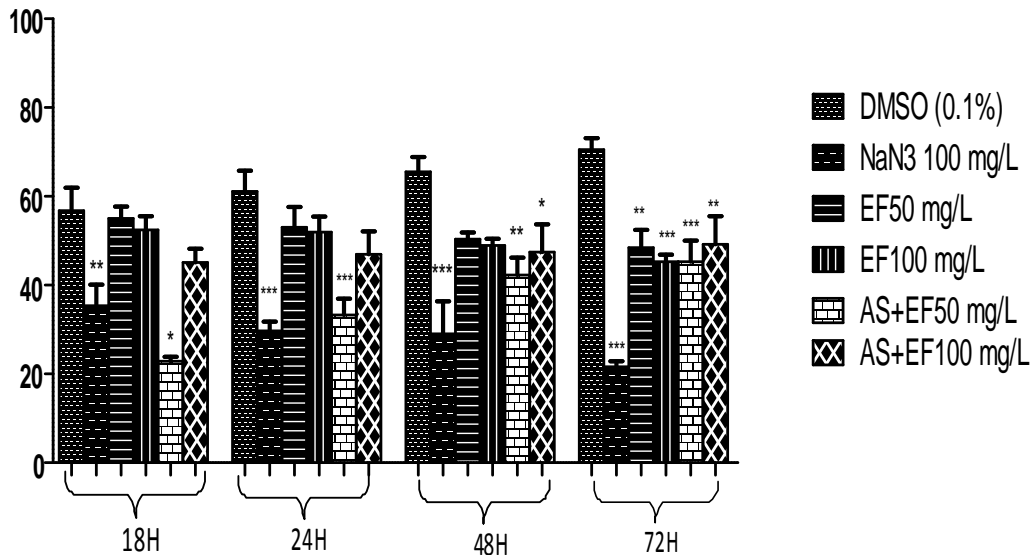


Figure 24: Histogramme d'antigénotoxicité des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et l'azide de sodium.

D'après l'histogramme obtenu par l'analyse statistique de l'indice mitotique des racines de *Allium cepa* traitées par l'azide de sodium (100mg/L) et les différentes concentrations des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, des augmentations significatives dans les IM ont été observées, ceci indique que cet extrait de feuilles a exercé un effet antigénotoxique. Il est à noter que cette amélioration des indices mitotiques est supérieure à celle obtenue par l'extrait de l'écorce. Quelques aberrations ont été apparues et rapportées dans la **figure 25**.

Chapitre III. Résultats et discussion

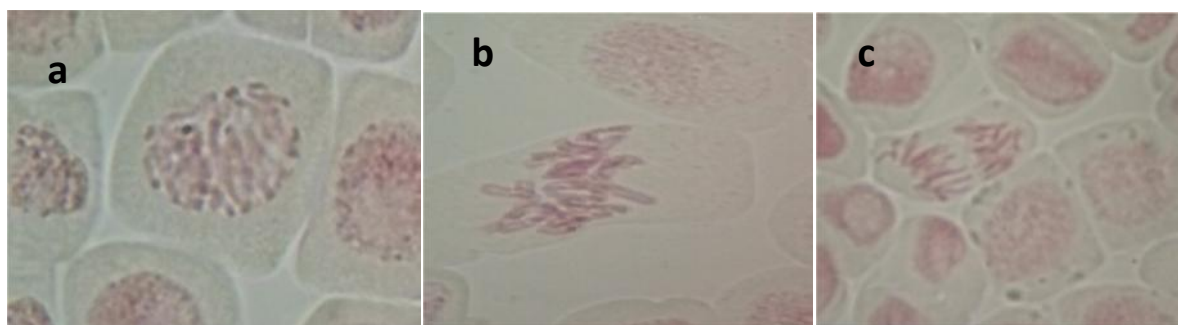


Figure 25: Photographies des aberrations chromosomiques lors du traitement antigénotoxique des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* (X40 et X100). (a) C-mitose ; (b) métaphase perturbée ; (c) anaphase perturbée.

Les C-mitose sont abondantes par rapport aux autres aberrations chromosomiques voir (Annexes N° 5, 6, 7,8). Le pourcentage de ces différentes aberrations chromosomiques est calculées et motionnée dans le **tableau IX**

Tableau IX: Pourcentage des aberrations chromosomiques lors du traitement antigénotoxique par les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Traitements	% des aberrations chromosomiques			
	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
	Prélèvement (18H)	Prélèvement (24H)	Prélèvement (48H)	Prélèvement (72H)
Eau distillée	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
AS+ EF 50mg/L	3.28±0.4 ^{fff}	3.19±0.18 ^{fff}	2.42±0.95 ^{ff}	2.00±0.41 ^{fff}
AS+ EF100mg/L	2.28±0.2 ^{fff}	1.28±0.19 ^{fff}	1.42±0.08	1.41±0.07 ^{fff}

AS : azide de sodium EF : extrait de feuilles

Le pourcentage des aberrations chromosomiques diminue en fonction du temps. Le traitement combiné de l'azide sodium et l'extrait de feuilles (50mg/L) est hautement significatif pour les trois intervalles de temps (18H, 24H, 72H), significatif à 48H, pour les trois intervalles de temps (18H, 24H, 72H) le traitement combiné entre l'azide de sodium et l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* est hautement significatif, non significatif à 48H. Ceci prouve que l'extrait de feuilles a eu un impact antigénotoxique sur les racines de *Allium cepa* et cet effet est un peu plus supérieur à celui de l'extrait de l'écorce.

III.2. Discussion :

III.2.1. L'extraction :

Il existe plusieurs protocoles standards d'extraction de principes actifs à partir des plantes, néanmoins, l'utilisation des solvants permet d'optimiser l'extraction surtout de séparer et de sélectionner les composés phénoliques, par diffusion dans les tissus de la plante, en utilisant une matrice liquide (**Escribano-Bail, 2003**).

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction tels que : le prétraitement des échantillons (diamètre de la poudre), le ratio entre solvant/échantillon, le type de solvant, le temps de l'extraction et la température (**Spingo et al., 2007 ; Xiao et al., 2009**).

Dans cette étude, l'extraction a été réalisée par l'éthanol, considéré comme le solvant le plus adéquat pour obtenir un maximum de polyphénols, suite à des études comparatives entre différents extraits issus des plantes, où les extraits éthanoliques ont montré de meilleurs rendements (**Adjobimey et al., 2004**).

La différence dans les pourcentages d'extraction entre les feuilles et les écorces de *Fraxinus angustifolia*, réalisées par le même solvant et dans les mêmes conditions est reliée beaucoup plus à la nature des tissus et les matrices végétales, c'est-à-dire que l'écorce est constitué par des cellules mortes, imperméables qui permettent les échanges gazeux (respiration des cellules qui composent les tissus vivantes sous-jacents comme l'aubier), par contre les feuilles se composent de cellules vivantes et renouvelables (le xylème et le phloème primaire), tout comme les jeunes tiges et les racines (**Xiao et al., 2009**).

III.2.2. Tests de génotoxicité / antigénotoxicité :

Les plantes médicinales et leurs utilisations ont été corrélées avec les changements génomiques causés par de multiples facteurs (UV, Radiations ionisantes...etc.). Des études sur leurs propriétés sont nécessaires pour mener à une utilisation sûre et efficace (**Akirbora et Bakare, 2007 ; Franchinnetto et al., 2007**). Par conséquent, il est important d'évaluer leurs deux propriétés génotoxique et le potentiel protecteur du matériel génétique (**Rani et al., 2005 ; Fernandes et al., 2007**).

A cet effet, le test *Allium cepa* s'avère le mieux caractérisé et le premier validé par le Programme International sur la Sécurité Chimique (PISC, OMS) et le Programme Environnemental des Nation Unies (**Cabrera et Rodriguez, 1999 ; Rani et al., 2005**).

Chapitre III : Résultats et discussion

En plus il nous renseigne sur les paramètres communs de la cytogénétique tels que l'indice mitotique, les anomalies chromosomiques, la croissance des racines et également il a été utilisé comme paramètre microscopique (Rojas *et al.*, 1993 ; Nielson et Rank, 1994 ; Amin, 2002). L'efficacité de ce test a été démontré, puis fréquemment utilisé pour évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des eaux (Tatiana *et al.*, 2005 ; Chukwujekwu et staden, 2014), des herbicides (Kwankua *et al.*, 2010), des sols (Kavalchuk *et al.*, 1998 ; Saghirzadeh, 2008 ; Sharma *et al.*, 2009), des métaux lourds (Milan, 1995 ; Sifa, 2008), des agro-alimentaires (Turkoglu, 2007), des déchets industriels (Marin *et al.*, 2009), des pesticides (Khyat et kum, 2009; Sifa, 2012) et récemment adapté aux extraits de plantes (Safaa *et al.*, 2012 ;Deborarah *et al.*, 2013 ;Timothy *et al.*, 2014).

III.2.2.1. Taux de croissance des racines :

Le changement morphologique, l'inhibition ou le retard de la croissance des racines de *Allium cepa* sont des paramètres macroscopique pris en considération dans le but d'évaluer la cytotoxicité cellulaire, ces indicateurs de cytotoxicité sont la conséquence d'une diminution dans le nombre de cellules en division (Fiskesjo, 1997; Babatunde et Bakare, 2006; Yidiz *et al.*, 2009), aussi les aberrations chromosomiques peuvent s'intercaler avec la croissance des racines de *Allium cepa* résultant d'un effet cytotoxique de l'agent mutagène impliqué (Kovalchuk *et al.*, 1998).

L'azide de sodium est un important mutagène, car il provoque une cytotoxicité dans plusieurs plantes tels que *Allium cepa*, en inhibant la synthèse des protéines et de l'ADN répliatif (Salamone, 1994), ceci va bloquer la division cellulaire, ce qui conduit à un retard de croissance des racines (Grover et Tejpar, 1981; Bakar et Wal-adetemo, 2004). Dans d'autres études apportées sur cet agent, son action mutagénique dépend du métabolisme ou l'état de l'ADN dans la phase S du cycle cellulaire des graines de *Triticum aestivum L* (Kleinhofs, 1978).

La sensibilité de la croissance des racines de *Allium cepa* par rapport à l'azide de sodium est plus grande à des doses plus élevées et ceci a été confirmé par l'étude de Sheikh *et al.*, (2012) sur les graines de *Triticum aestivum L*, ces résultats ont été attribués à divers facteurs impliqués dans l'activité métabolique des cellules. Il a été rapporté également que cet agent peut inhiber la respiration cellulaire, ce qui conduit à l'apoptose (Konzak *et al.*, 1975 ; Kleinhofs, 1978).

Chapitre III : Résultats et discussion

La réduction de la croissance des racines peut être expliquée par la présence de certains métaux lourds dans le sol ou dans la plante elle-même (*Allium cepa* ou *Fraxinus angustifolia*), ce qui inhibe la croissance des organes végétatifs de certaines espèces de plantes (**Hyder et al., 2004; Yildiz et al., 2009**).

Le traitement des racines de *Allium cepa* avec les extraits de plantes conduit à une diminution de la croissance dépendante de la concentration (**Akimboro and Bakare, 2007 ; Yildiz, et al., 2009**). De ce fait, on suggère que le changement des racines traitées avec l'extrait de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est dû à des interactions des composés contenus dans ces deux extraits avec les molécules cellulaires de *Allium cepa*, ce qui induit à un retard de croissance concentration dépendant. Cette même constatation a été trouvée dans l'étude de **Timothy et al. (2014)** sur les extraits de feuilles de *Ipomoea trichantha*, et celle réalisée sur l'effet des extraits sur *Distephanus angulifolius* par **Chukwujekwu et Van Staden (2014)**.

III.2.2.2. Indice mitotique (IM) :

L'indice mitotique est caractérisé par le nombre total des cellules qui se divisent durant le cycle cellulaire, il est utilisé comme indicateur de la prolifération cellulaire en mesurant la proportion des cellules en mitose (**Gadano et al., 2002**). C'est un paramètre pour évaluer la cytotoxicité de plusieurs agents (**Kovalchuk et al., 1998 ; Yuet pinng et al., 2012; Chukwujekwu et Van Staden, 2014**).

Une réduction de l'indice mitotique par rapport aux contrôles négatifs est un indicateur de la cytotoxicité et ceci de manière dépendante de la concentration appliquée et du temps d'exposition (**Jane et al., 2010**).

Lors du traitement des racines de *Allium cepa* avec des agents mutagènes chimiques, des mauvaises ségrégations chromosomiques peuvent avoir lieu, ceci conduira à la diminution de l'indice mitotique (**Yildiz et al., 2009**). Cette diminution de l'indice mitotique dans les cellules méristématiques des racines de *Allium cepa* peut être interprétée comme une mort cellulaire (**Dail et al., 2012 ; Kwan, 2012**).

L'azide de sodium se dissout facilement dans l'eau et légèrement soluble dans l'alcool (**Arenaz et al., 1983**). Il forme un gaz hydrogène azide très toxique avec production d'ions d'azide qui peuvent être la raison de sa genotoxicité dans le système *Allium cepa*.

Chapitre III : Résultats et discussion

L'augmentation de la concentration de l'azide de sodium et la durée d'exposition a entraîné une diminution correspondante au pourcentage de l'indice mitotique (**Ragunathan et Panneerselvm, 2007 ; Saxena et al., 2010**). L'azide de sodium peut entraver un système d'énergie ayant comme résultat la diminution de la croissance des plantes et par conséquent l'inhibition de la mitose (**Konzak et al., 1975 ; Kleinhofs, 1978**). C'est un agent génotoxique fort dans la plupart des espèces eucaryotes et procaryotes (**Kleinhofs et al., 1978**), mais il paraît être moins génotoxique chez les mammifères par rapport aux végétaux (**Arenaz et Nilan, 1981; Arenaz et al., 1983**). Une explication possible, c'est que les cellules des mammifères ne possèdent pas la machinerie enzymatique pour convertir l'azide de sodium à un agent mutagène ou bien elles le transforment à un agent intermédiaire chimique dépourvu de pouvoir mutagène, ce qui n'est pas le cas chez les végétaux, ceci est prouvé par l'étude de **Sheikh et al., 2012** sur l'espèce *Triticum aestivum* L.

La diminution de l'IM indique un effet mito-dépressif (blocage de la synthèse de l'ADN et les protéines nucléiques) et prolongation de la durée du cycle cellulaire (phase S), suite à des troubles de mitose, dû à des interférences probables du mutagène avec le développement mitotique normale (**Saxena et al., 2010 ; Mesi et Kopluku, 2013**). Le déclin considérable de l'indice mitotique peut être alors dû à l'inhibition de la synthèse de l'ADN en phase S du cycle cellulaire par déstabilisation de la double hélice, qui induit des troubles au niveau de la chromatine, comme il peut y avoir un blocage de la phase G1 qui supprime la synthèse d'ADN (**Mesi et Kopluku, 2013**).

La réduction de l'IM chez *Allium cepa* peut être due soit à l'inhibition de la synthèse de l'ADN en phase S ou au blocage de la phase G2 de cycle cellulaire, soit à l'arrêt du métabolisme de glucose et appauvrissement de l'adénosine triphosphate (**Chukwujekwu et Staden, 2014**).

Les extrémités méristématiques des racines de *Allium cepa* sont très sensibles aux polluants environnementaux, ce qui réduit le taux de croissance et l'indice mitotique (**Milan et al., 1995**).

Suite à une interférence des métaux lourds avec le développement normal de la mitose, l'indice mitotique diminue significativement et ceci en empêchant un nombre de cellules d'entrer en prophase et le blocage de la division cellulaire en interphase, aussi ces métaux lourds peuvent agir en diminuant la durée de la phase G et S (**Yildiz et al., 2009**).

Chapitre III : Résultats et discussion

On suggère que la diminution de l'indice mitotique lors du traitement avec les extraits de l'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia* est due à des perturbations dans le cycle cellulaire. Cela pourrait être lié à la fréquence des aberrations chromosomiques qui sont proportionnelles avec la concentration des extraits correspondants (**Timothy et al., 2014**).

III.2.2.3. Aberrations chromosomiques :

Les aberrations chromosomiques sont des changements dans la structure ou dans le nombre des chromosomes, résultant d'une rupture ou d'échange de matériel génétique, ce qui peut être produit de façon spontanée ou bien suite à l'exposition de l'intégrité physique et/ou des agents chimiques (**Tartar et al., 2006**). Elles sont considérées comme un paramètre efficace pour étudier le potentiel génotoxique des traitements analysés, tels que les extraits de plantes médicinales, tout en permettant de caractériser leur actions clastogéniques et/ou aneugéniques (**Sifa et al., 2006 ; Haywood et al., 2012**).

L'observation des aberrations chromosomiques est un indicateur de toxicité sur le matériel génétique, ces aberrations peuvent conduire à des dommages cellulaires et compris l'apoptose (**Mazzeo et al., 2011**). Elles peuvent être dues au blocage de la synthèse de l'ADN ou à l'inhibition de la formation des fuseaux mitotiques (**Dimitry et Romanovsky, 2013**).

Les aberrations chromosomiques observées lors du traitement des racines de *Allium cepa* par différentes concentrations de *Icacina trichanthades* sont généralement : les C-mitose ; des cassures ; des ponts chromosomiques et des métaphases, anaphases perturbées (**Timothy et al., 2014**).

L'aberration chromosomique de type C-mitose c'est l'anomalie la plus fréquente, elle peut être réversible lorsque l'agent mutagène induit une faible toxicité, mais elle peut engendrer une polyploïdie dans le cas où elle n'est pas reversée (**Fiskesjo, 1995; Odeigah et al., 1997; Carita et marin, 2008; Chukwujekwu et Staden, 2014**). La C- mitose autrement connu comme la mitose de colchicine est une inactivation du fuseau mitotique suivie d'une dispersion aléatoire des chromosomes au cours de la division cellulaire. Une division retardée du centromère peut avoir comme résultat des chromosomes perturbés empêchant la séparation des chromatides sœurs (**Timothy et al., 2014**).

Chapitre III : Résultats et discussion

Les ponts chromosomiques peuvent être le résultat d'une formation dicentrique chromosomique en raison de dysfonctionnement lors de la rupture du lien chromosomique (**Ben Ammar et al., 2008**), ils peuvent être provoqués par la rigidité des chromosomes qui ont fait leurs séparation, donc ils sont restés reliés par des ponts (**Kwan et al., 2012**).

Les ponts chromosomiques observés au cours des étapes anaphases et télophases de cycle cellulaire sont probablement une conséquence d'une perte d'un fuseau mitotique inactif pendant le cycle de division cellulaire (effet aneugène) (**Pelwa et al., 1984**). Les ponts se produisent probablement par l'interruption et l'assemblage des chromosomes, des chromatides ou à la suite de chromosome collant. Il peut également être attribué à la translocation inégale ou inversion du chromosome segmenté (**Liman et al., 2010 ; Timothy et al., 2014**), comme ils peuvent être le résultat d'une cassure chromosomique (**Radic et al., 2010**).

L'anaphase anormale est due à une séparation irrégulière des chromosomes ce qui résulte des chromosomes isolés, le fragment acentrique en anaphase est le résultat d'un chromosome ou d'une chromatide interrompue, indiquant une interférence de l'ADN (**Timothy et al., 2014**), tandis que la métaphase perturbée est un type de perturbation de l'appariement et la disjonction des chromosomes et généralement il en résulte des chromosomes perdus et isolés. Ces deux anomalies chromosomiques dues à un changement qualitatif et quantitatif de kinetochore et de la chromatine (**Carita et Marin, 2008**).

Selon **Kumari et al. (2011)**, les produits chimiques augmentent le pourcentage des aberrations chromosomiques en fonction de leur concentration et d'après **Yildiz et al., (2009)**, leur fréquence augmente en fonction du temps d'exposition, pour cette raison qu'elles sont significativement plus élevées dans le contrôle positif par rapport aux autres traitements. En effet, l'azide de sodium (NaN₃) dans cette étude a montré un effet génotoxique incluant le pourcentage des aberrations proportionnel aux temps et à sa concentration.

Kwan et al., (2012) ont confirmé que les aberrations chromosomiques sont dues aux effets des extraits de *Euphorbia hirta* sur la formation des fuseaux mitotiques et par conséquent des troubles de la division cellulaire. Les aberrations chromosomiques observées dans cette étude sont évidemment causés par les constituants chimiques présents dans les extraits puisque aucune aberration a été observée chez le témoin négatif.

Chapitre III : Résultats et discussion

En outre, l'effet cytotoxique augmente proportionnellement à la concentration des extraits des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, ces résultats ont été aussi prouvés par **Timothy et al., (2014)** pour l'extrait de feuilles de *Icacina trichantha*.

Dans le test antigénotoxique, l'indice mitotique a marqué une augmentation significative selon la dose et le temps d'exposition des racines de *Allium cepa* aux extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, ainsi le pourcentage d'aberrations diminue en fonction du temps et de la dose, ceci prouve un effet antigénotoxique de ces extraits, alors cette activité est le résultat des composés contenus dans ces extraits de plante ayant le pouvoir de protéger les cellules de *Allium cepa* contre les dommages induits par l'azide de sodium.

A partir de ces résultats on déduit que ces extraits bruts de compositions complexes, aussi bien des feuilles que des écorces de *Fraxinus angustifolia*, abritent des composés qui ont pu s'interférer avec les composantes du cycle cellulaire et induire un effet génotoxique, mais aussi des composés ayant un pouvoir protecteur vis-à-vis des aberrations chromosomiques induites par l'azide de sodium.

L'activité anti-génotoxique des extraits de plantes peut être attribuée à ses composés phénoliques. Ces métabolites ont été détectés auparavant dans l'extrait de *Rhamnus alaternus L.*, dans le même ordre que leur effet antigénotoxique. Il est possible que ces composés ayant des propriétés antigénotoxiques participent à l'effet inhibiteur direct des mutagènes (**Ben Ammar, 2008**). Les flavonoïdes peuvent inhiber les mutations provoquées grâce au pouvoir de piégeage des électrophiles. Une corrélation entre les antioxydants et les activités antigénotoxiques des extraits de *Rhamnus alaternus* a été rapporté (**Ben Ammar 2008; Bouhlel et al., 2008**).

D'autre part, les propriétés antigénotoxiques provoquées par des espèces végétales ont une gamme complète d'applications potentielles en santé humaine. Les plantes médicinales et les médicaments phytothérapeutiques contenant des principes actifs sont actuellement développés pour protéger contre les électrophiles (des radicaux libres) et les attaques sur l'ADN. Ces résultats ont été largement répandus sur le vieillissement et le cancer (**Ben Sghaier et al., 2011**).

Dans l'étude faite par **Boeira et al. (2010)**, l'effet des polyphénols dépend de leurs concentrations. Suite à des études comparatives, les mêmes résultats obtenus après traitement combiné des racines de *Allium cepa* avec l'azide de sodium et les différentes concentrations des extraits de *Fraxinus angustifolia*, on suggère que les polyphénols précédemment dosés dans ces derniers ont des propriétés antigénotoxiques.

Conclusion

Après avoir prouvé leur potentiel de guérison, les plantes médicinales ont fait l'objet de plusieurs études thérapeutiques dans le but d'évaluer leurs caractéristiques positives ainsi que négatives. Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. *Fraxinus angustifolia* est parmi ces plantes doté de ces pouvoirs mais la dose parfaite et le temps d'exposition au traitement par cette plante restent inconnus, sachant que un surdosage ou un faux usage pourrons engendrer des effets secondaires voir une toxicité cellulaire.

Cette étude est réalisée afin de contribuer à l'étude des effets des extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et la détermination de leurs potentiel cytotoxique génotoxique, par l'usage d'un modèle *in vivo*, *Allium cepa*.

L'azide de sodium est utilisé dans cette étude comme un témoin positif, il a montré un effet génotoxique et cytotoxique sur les racines de *Allium cepa*, notamment à 100mg/L et à 72H, alors que les extraits éthanoliques de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont montré une faible génotoxicité à des concentrations élevées (300mg/L et 500mg/L), et l'exposition des racines de *Allium cepa* pour des durées de temps prolongées accentue cet effet génotoxique.

Le test antigénotoxique et anticytotoxique réalisé par une combinaison entre les extraits de feuilles ou de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et l'azide de sodium (100mg/L) sur les racines de *Allium cepa* a montré des résultats très prometteurs et ceci après une analyse statistique de l'indice mitotique et du taux de croissance, les extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont augmenté l'indice mitotique et réduit la mal formation des racines de *Allium cepa* observé dans le contrôle positif, selon la dose et le temps d'exposition à ce traitement. De même, le pourcentage des aberrations a marqué une diminution significative comparativement au contrôle positif (NaN₃) lors de ce traitement antigénotoxique par *Fraxinus angustifolia*.

Les résultats obtenus sur la cytotoxicité et/ou la génotoxicité des extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* peuvent être exploités dans différentes activités biologiques notamment l'activité anticancéreuse si cet effet ciblera spécifiquement les cellules à différenciation incontrôlables (cellules endommagées).

Conclusion

A son tour l'effet antigénotoxique des extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* serait intéressant pour protéger le génome des effet néfaste des traitements chimiques.

Au terme de cette étude et ces résultats, on suggère l'utilisation des extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à faibles doses et à un temps réduit.

Cette étude représente une initiation à la recherche des composés actifs à intérêts biologiques. Elle constitue une partie d'une thématique très intéressante, il serait en perceptives de l'approfondir par :

- La nature des composés responsables de cette génotoxicité, induite par les extraits des plantes,
- Les substances cytotoxiques ou génotoxique contenus dans ces extraits méritent également d'être purifiées pour l'étude de leurs mécanismes d'action,
- La vérification de ces résultats par une application sur d'autres types de cellules, en utilisant d'autres types de mutagènes.

Références Bibliographiques

-A-

Adjobimey, T., Edayé, I., Laghika, L., Genou, J., Moudachirou, M. and Sanni, A. (2004). Activités antiplasmodiales *in vitro* de quelques plantes antipaludiques de la pharmacopée béninoise. *Compte Rendu de Chimie* 7,1023-1027.

Akinboro, A. and Bakare, A.A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effect of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* linn. *Jornal of Ethnopharmacology* 112, 470-475.

Alameda, D. and Villar, R. (2012). Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angustifolia* Vahl seedlings under soil compaction conditions. *Environmental and Experimental Botany* 79, 49– 57.

Amin, A.W. (2002). Cytotoxicity testing of sewage water treatment using *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(2):184 – 188.

Ami ,D., Davidovi -Ami ,D., Bešlo, D. and Trinajsti ,N. (2003). Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *croatica chemica acta ccacaa*76: 55-61.

Arenaz, P., and Nilan, R. A. (1981). Effect of sodium azide on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes and Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 88, 217-221.

Arenaz, A., Nilan, A., and Kleinhofs, A. (1983). Lack of induction of single-strand breaks in mammalian cells by sodium azide and its proximal mutagen. *Mutation Research*, 116, 423-429.

Arnauld, A., Galzy, P. and Guiraud, J. (1991). Le génie génétique. Biotechnologie 5^{ème} édition. Technique et documentation Paris. P 417-420.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debache, N. and Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* 122, 303-309.

-B-

Babatunde, B.B. and Bakare, A.A. (2006). Genotoxicity screening of waste waters from Agbara Industrial Estate, Nigeria evaluated with *Allium* test. *Pollut . Res.* 25 (2), 227–234.

Bailen, M., Julio, L., Carmen, E., Diaz, J., Rafael, A., Raimundo, C., Burillo, J. and Azucena.(2013). Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 49, 102- 107.

Bakare, A.A., Wall, A.A and Osibanjo, O. (2004). Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa* L. *Environ. Biol.* 21, 263–27.

Références Bibliographiques

Barbara, J.S., Sanderson, A. and Shield, J. (1996). Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutation Research* 355, 41-57.

Bassaglia, Y. (2001). Biologie Cellulaire. Edition Maloine-23, rue de l'école-de-Médecine, 75006 Paris, pp :56-120. ISBN: 2 224 -02650.

Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhour, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2008). Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions* 174, 1–10.

Blumenthal, M. (1998). The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines. *American Botanical Council, Austin*. 34, 57-68.

Boeiraa, J.M., Fennerc, R., Andresa H. B, Provensi, G., Luciana, A., Lacerda, P.R., Barbosad, G.F.H. Corrae, A.M.R., Driemeiere, D., Dall'Albaa, M.P., Pedroso, A.P., Gosmann, G., Silva, J. and Rates, S.M.K. (2010). Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 526–532.

Ben Sghaier, M., Bhour, W., Neffati, A., Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, S. and Kilani, C.L. (2011). Chemical investigation of different crude extracts from *Teucrium ramosissimum* leaves. Correlation with their antigenotoxic and antioxidant properties. *Food and Chemical Toxicology* 49, 191–201.

Bouhlel, I., Valenti, K., Kilani, S., Skandrani, I., Ben Sghaier, M., Mariotte, A., Dijoux-Franca, M., Ghedira, K., Hininger-Favier, I., Laporte, F. and Chekir-Ghedira, L. (2008). Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of *Acacia salicina* extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H₂O₂ and ASE treatment. *Toxicology in Vitro* 22, 1264–1272.

Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, Dal Pra, L., De Ferrari, L. and Degrassi, F. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans, Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Gene Cytogenet Feb*; 79 (2):133-5.

Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, I., Ben sghaier, M., Neffati, A., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2010). Mutagenic, antimutagenic and antioxidant potency of leaf extracts from *Nitraria retusa*. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2283–2290.

Breu, W. (1996). *Allium cepa* L. (Onion) Part 1 : Chemistry and analysis. Institut fur Pharmazeutische biologie, Universitar Miinchen, Germany, Selectavet, Weyarn-Holzolling Germany *phytomedicine*, 3(3), 293-306.

Bruneton, J. (1997). Pharmacognosie, phytochimie, *plantes médicinales*. Impr. CEE PP 315-338.

Références Bibliographiques

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition, lavoisier, Paris, 1120 p.

Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G. and Swinnen, J. V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry*.280(7): 5636-5645.

Bylka, W., Mathawska, I., and Pilewski, N. A. (2004).Natural flavonoid as antimicrobial agents.*Journal of the American Nutraceutical Association.*, 7 (2): 24-26.

- 6 -

Cabrera, G. and Rodriguez, D. (1999). Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutat Res* 426: 211-214.

Çali , I., Hosny, M., Khalifa, T. and Nishibe, S. (1993).Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*.*Phytochemistry*, 33:1453-1456.

Calis, I., Hosny, M. and Lahloub, M. F. (1995).A secoiridoid glucoside from *fraxinus angustifolia*.*Phytochemistry*, Vol. 41, No. 6, pp. 1557.-1562.

Çali , I., Hosny, M. and Lahloub, M. (1996).A secoiridoid glucoside from *Fraxinus angustifolia*.*Phytochemistry* , 41:1557-1562.

Carita, R. and Marin-Morale, M.A. (2008). Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere* 72.P 722-725.

Carla, R., Andrighetti-Fr, O., Jadel, M., Regina, V., Antonio, B., Creczynski-Pasa, R.M., Barardi, and Cláudia, M.O. (2006). *In vitro* testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutation Research* 603, 97–103.

Champoux, J.J. (2001). DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369-413.

Chukwujekwu, J.C. and Van Staden.J. (2014). Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. *South African Journal of Botany* 92, 147–150.

Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations". *Mol Biotechnol*.26 (3): 249–61.

Références Bibliographiques

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, 12(4): 564-570.



Dail, H., Prá, D., Silva-Stenico, M., Rieger, A., Frescura, D., Fiore, M.F. and Tedesco, S.B. (2012). Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment* 432,180–188.

Deborah, S. B. S. S., Benhur, B., Anuska, C. F. S., Garcia., B. Charles S.E., Vitor A.N., Andre, L. L. M. S., Antonio S. D., Scher, R.A. and Pantaleao, S.M. (2013). Investigation of protective effects of *Erythrina velutina* extract against MMS induced damages in the root meristem cells of *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian. Journal of Pharmacognosy* 23(2): 273-278.

Dhawan, A., Bajpayee, M., and Parmar, D. (2009). "Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models." *Cell Biology and Toxicology* 25(1): 5-32.

Dilek, O. and Hulya, S. (2013). Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 38–43.

Ding, W., Hudson, L.G., Sun, X., Feng, C. and Liu, K.J. (2008). As (III) inhibits ultraviolet radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimer repair via generation of nitric oxide in human keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1065–1072.

Dmitry, S., Pesnya., A. and Romanovsky, V.(2013). Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. *Mutation Research* 750, 27– 33.

Do A. F. J. (1972). *Fraxinus*. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, editors. *Flora Europaea*. Vol 3. University Press, Cambridge, 53-54.

Doll, R. and Peto, R. (1981). The causes of cancer. Quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today: Oxford University Press, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 21, Issue 4, Pages 512-513.

Donath, F., Quispe, S., Diefenbach, K., Maurer, A., Fietze, I. Amaral, K.M., Schenkel, E.P. and Langeloh, A. (2000). Avaliacao da toxicidade e produtividade de extratos de Passiflora alata Dryander Passiflora edulis Sims em ratos Wistar. *Acta Farmaceutica Bonaerense* ,20, 215–220.

Références Bibliographiques

Dongxiao, S., Huihui, T., Ruifen, Z., Mingwei, Z., Zhengchen, W., Yuanyuan, D. and Jinxin, G. (2014).Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp, *Food Chemistry*, Volume 158, Pages 385-39.

Dvaranauskait , P., Venskutonis, R., Raynaud, T., Talou, P., Viškelis, A. and Sasnauska, T. (2009).Variations in the essential oil composition in buds of six blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars at various development phases.*Food Chemistry*114, 671-679.

-E-

Ebrahimi, L., Habibi-Khorassani, M., Badichi, A.F., Farrokhzadeh, A. and Karimi, P. (2013). Caffeine as base analogue of adenine or guanine: A theoretical study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 42, 81–91.

Edwards, L.,Whitter, E. and Hessinger, D.(2002).Apparent membrane pore-formation by portuguese Man-of-war (*Physalia physalis*) venom in intact cultured cells. *Toxicon*, Volume 40, 1299-1305.

Elespuru, R.K. and Sankaranarayanan, K. (2007).New approaches to assessing the effects of mutagenic agents on the integrity of the human genome. *Mutation Research* 616, 83–89.

El Ouariachi, E., Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi,L., Costa, J., Paolini, J. and Chetouani, A. (2014).Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss.and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, Volume 4, Issue 4, August , Pages 281-286.

Escribano-Bailon, M.T. and Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenols extract from food. In: method in polyphenol analysis. Edition Royal Society of Chemistry, 1-16.

-F-

Fachinnetto, J.M., Bagatini, M. D., Durigon, J., Silva, A. and Tedesco, S. (2007). Anti-proliferative effect of infusions of *Achyrocline satureioides* on the *Allium cepa* cell cycle.*Rev Bras Farmacogn* 17: 49-54.

Fahad, A., Fahad, M., AL-hemaid1, Salim, K., Ajmal, A., Tarroum, M. and Ashraf, M. (2011). Detection of Sodium Azide-induced mutagenicity in the regenerated shoots of *artemisia annua* L., using internal transcribed spacer (its) sequences of nrDNA.*Pak.J. Bot.*, 43(4): 2183-2186.

Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. and Guo, Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique.*Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*,64(2) : 159-164.

Références Bibliographiques

Fenwick,R., Lutomski,J. and Nieman, J. (1990).Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.Composition, uses and analysis.*Food Chemistry* 38, 119-143.

Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M., Monarca, S. (2007).*Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit.Contam.*24 (6): 561-572.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C. and Marin-Morales, M.A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic.Biochem. Phys.* 88, 252–259.

Fernandes, L.M., Garcez, W.S., Mantovani, M.S., Figueiredo, P.O.,Fernandes, C.A., Garcez, F,R. and Guterres, Z.R. (2013).Assessment of the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of extracts and indole monoterpene alkaloid from the roots of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae).*Food and Chemical Toxicology* 59,405–411.

Ferreira, F., Kemmelmeier, C., Arrotéia, C., Costa, C. and Mallmann,C.(2013).Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link.*Food Chemistry*136, 789-793.

Fiskejö, G. (1994). The *Allium* Test II: assessment of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environ Toxicol Water Qual*; 9:235–41.

Fiskesjo, G. (1995). *Allium* test: In vitro toxicity testing protocols. *Meth. Mol. Biol.*; 43: 119-127.

Fiskesjo, G. (1997). *Allium* test for screening chemicals evaluation of cytological parameters in:W.Wang, JW Gorsuch, JS Huges (eds.) *Plants for Environmental Studies*, CRC, Lewis Publishers, New York, pp. 307-333.

Fornace, A.J. and Kohn, K.W. (1976). DNA-protein cross-linking by ultraviolet radiation in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts, *Biochim.Biophys. Acta*, 435, 95-103.

Frankenberg-Schwager, M. (1990)."Induction, repair and biological relevance of radiationinduced DNA lesions in eukaryotic cells." *Radiation and Environmental Biophysics* 29(4): 273-292.

Références Bibliographiques



- Gadano, A. (2002).** *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 8741(01) 00418-4.
- Gaedcke, F. (1993).** *Fraxinus*. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, editors. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Drogen E-O, Vol 5. 5th ed. Springer-Verlag, Berlin, 188-200.
- Gahbiche, S. (2009).** La phytothérapie. Ecole supérieure des sciences et technique. Santé de sousse. : hydro-thermo-thalassothérapie.
- Galabov, A.S., Iosifova, T., Vassileva, E. and Kostova, I. (1996).** Antiviral activity of some hydroxycoumarin derivatives. *Z Naturforsch C*, 51:558-562.
- Garcia, D., Garcia-Cela, E., Antonio, J., Ramos, V. and Marín, S. (2011).** Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. *Food Control* 22, 1378-1384.
- Ghedira, k. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, 3(4) : 162-169.
- Gracieli, D.N, Tamara, P. Haywood, Dail, L., Thais, S., Solage-Bosio., T. (2010).** Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *BIOCELL* 34(3): 95-101.
- Grand, p. (2006).** Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière: L'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl). Thèse de doctorat en Science Forestière. Ecole Nationale de Génie Rural, des Eaux et Forête, Centre de Paris. 29-34.
- Grant, W.F. (1982).** Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 99,273-291.
- Grant, W.F. and Salamone, M.F. (1994).** Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310, 187-209.
- Grover, I. S. and Tejpar, S.K. (1981).** Antagonistic effect of gamma radiation on dormant seed *Avena fatua*. *Radiation Botany* 15:435-450.
- Guignard, J. L. (2000).** Biochimie végétale, 2ème édition, Dunord, paris. P164-173.
- Guérard, M., Zeller, A., Singer, T. and Gocke, E. (2012).** *In vitro* genotoxicity of neutral red after photo-activation and metabolic activation in the Ames test, the micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research*, 746, 15– 20.

Références Bibliographiques

-H-

Hadi, M. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutique. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I, 155p.

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E. and Norppa, H. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* 15;58(18):4117-21.

Harkati, B. (2011). Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille *ASTERACEAE* : *Scorzonera Undulata* », thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine., P23.36.

Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert, U., Lowe, P., Suter, W., and Mueller, L. (2004). Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations." *Mutagenesis* 19(1): 51-59.

Haoyu, Y., Wenshuang, W., Zhuowei, L., Caifeng, X., Minghai, T., Shucui, L., Jianhong, Y., Huan, T., Kai, C., Chaofeng, L., Aihua, P., Yuqun, W. and Lijuan, C. (2014). Bioactivity-guided isolation of anti-inflammation flavonoids from the stems of *Millettia dielsiana* Harms, *Fitoterapia*, Volume 95, P; 154-159.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.

Hayder, N., Abdelwahed, S., Kilani, R., Ben Ammar, A., Mahmoud, K., Ghedira, L. and Chekir-Ghedira. (2004). Anti-genotoxic and free radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*, *Mutat. Res.* 564, 89–95.

Haywood, L. D., Pra, D., Stenico, M. E. S., Rieger, A., Frescura, V., Fiore, M. F. and Tedesco, S.B. (2012). Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment* 432.P180-188.

Hernandes, L.V., Ferro, A., Ribeiro de Almeida, M., D'arc Castania Darin, J., Eliseu, R., Lemos B.B., Barbosa, F.J., Mercadante, A. Z., Bianchi, M.L.P. and Greggi Antunes, L.M. (2014). *In vivo* assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential. *Food Research International* 62, 121–127.

Hollman, J., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. and Burrowe, J. (2007). Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids. *Journal of Nutrition*, 137, supp :718 -737.

Hoshina, M. and Maria, M. A. (2009). Micronucleus and chromosome aberration induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72.P2090-2095.

Références Bibliographiques

Hosny, M., Çali , I. and Nishibe, S. (1991).Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*.*Planta Med*, 57:S2 A81.

Hosny, M. (1998).Secoiridoid glucosides from *Fraxinus oxycarpa*.*Phytochemistry*, 47:1569-1576.

-J-

Iossifova, T., Kostova, I. and Evstatieva, L. (1997). Secoiridoids and hydroxycoumarins in Bulgarian *Fraxinus* species. *Biochem Syst Ecol*, 25:271-274.

Izquierdo, J. I., Machado, F., Ayllon, V. L., D'Amico, L. O., Bala, E., Vallarino, R., Elias and Garcia-Vazquez, E. (2003)."Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 24-29.

-J-

Jane, M., Boeiraa, R.F., Andresa, H., Betti, C., Gustavo, P., Luciana de A. Lacerdad, P.R., Barbosad, F.H.D., Gonzálezd, A.M., Corrêae, D.D., Marília, P., Dall'Albaa, A. P.,Pedroso, Grace, G., Juliana da, S. and Stela, M.K. (2010).Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) *Journal of Ethnopharmacology* 128, 526–532.

Jha, S.K.,Nayak, A.K. Sharma, S.K. (2009). Fluoride toxicity effects in onion (*Allium cepa* L.) grown in contaminated soils. *Chemosphere* 76, 353–356.

John, L., Devaney, Marcel, A., Jansen, M. and Whelan, w. (2014).Spatial patterns of natural regeneration in stands of English yew (*Taxus baccata* L.); Negative neighbourhood effects.*Forest Ecology and Management*, 321,52-60.

-K-

Khyati, S. and Kum Kum, M. (2009).Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*.*Pesticide Biochemistry and Physiology* 93, 8–12.

Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D. and Vanparys, P. (2011). A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutation Research* 721, 27–73.

Klanner, R., Fretwurst, E., Pintilie, I., Schwand, J. and Zhang, J. (2013).Study of high-dose X-ray radiation damage of silicon sensors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 732, 117–121.

Références Bibliographiques

Kleinhofs, A., Sander, N. and Konzak, C. (1974). Azide mutagenicity--Mechanism and nature of mutants produced, in: Polyploidy and induced mutations in plant breeding, *International Atomic Energy Agency, Vienna*, pp. 195-199.

Kleinhofs, A., Owais, W.M and Nilan, R.A. (1978).Parabolic effect in Sodium Azide mutagenesis in barley.*Mut. Res.*, 55, 165-195.

Konzak, C., Niknejad, I., Wickham, I. and Donaldson, E. (1975). Mutagenic interaction of sodium azide on mutations induced in barley seeds treated with diethyl sulfate or N-methyl-N'-nitrosourea, *Mutation Res.*, 30:55-62.

Kostova, I. and Iossifova, T. (2007).Chemical components of *Fraxinus* species.*Fitoterapia* 2007, 78:85-106.

Kovalchuk, O., Arkhipov, I., Telyuk, .A., Hohn, P. and Kovalchuk,L. (1998). The *Allium cepa* inhabited chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutat. Res.* 415, 47–57.

Kruch, J. (1982). Biochimie étude médicale et biologiques. Vol1 Biologie cellulaire et moléculaire. Hemann Paris. P 31-238.

Kumar, G.A. and Roychoudhury, A. (1989).Effects of certain food dyes on chromosomes of *Allium cepa*.*Mutation Research*, 223, 313-319 313.

Kumari, M., Sudheer khan, S.,Pakrashi, S.,Mukherjee, A, and Chandrasekaran, N. (2011).Cytogenetics and genotoxic effects of zin oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*.*Jornal of Hazardous Materials*,190,613-621.

Kwankua, W., Sengsai, A., Kuleung, C. and Euawong, N. (2010). Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosiabicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 949–954.

Kwan, Y., Darah, I., Umi Kalsom, Y., Chen Y, and Sasidharan, S. (2012). Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay molecules, 17, 7782-7791.ISSN 1420-3049.

-L-

Leme, M. and Aparecida.M.M. (2009).*Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation research* 682.P71-81.

Liman, R., Akyil, D., Eren, Y., and Konuk, M. (2010).Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test.*Chemosphere* 80, 1056–1061.

Liman, R. (2013).Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. *Chemosphere* 93, 269–273.

Références Bibliographiques

-M-

Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges. 239p.

Marin, M., Maria, A. and Houshina, M. (2009). Micronucleus and chromosome aberration induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicolog and Environmental Safety* 72.P2090-2095.

Masanori, O. and kazuyuki, M. (1992). Straight correlation between mutagenic activity and B-galactosidase activity induced by monofunctional alkylating agents. *Mutation Research* 283, 83-86.

Meijer, L. and Jezequel, A. (2000). Progress in Cell Cycle, Research. Plenum Press, New York, Ducommun B, p 248.

Mesi, A. and Koplaku, D. (2013). Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. *Procedia Technology* 8, 19 – 26.

Mezzzo, D.E.F, Casimiro, T.C. and Aparecida, M. M. (2011). Cellular damage in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere*, 85.P13-18.

Michael, C., Ukaegbu. and Odeigah, P. (2009). The Genotoxic Effect of Sewage Effluent on *Allium Cepa*. Department of Cell Biology and Genetics, University of Lagos, Akoka, Lagos, Nigeria. *Report and Opinion*: 1(6).

Milan, B., Aramba, A., Sabrija, B. and Gordana, S. (1995). Toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa*, *lepidium sativum* l. and *daphnia magna*: comparative investigations and the practical. *Quality Control Center, Biological Laboratory* pp. 497-503.

Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455, 29–60.

Mpondo, M.E., Dibong, D., Flora, C., Priso, R. and Ngoye, A. (2012). Les plantes à phénols utilisées par les populations. *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.15, Issue 1: 2083-2098.

Références Bibliographiques

-N-

Naoko, S. and Sadao, I. (1995). Mutagenic synergism detected between dimethyl sulfate and X-rays but not found between N-methyl-N-nitrosourea and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. *Mutation Research* 331, 79-87.

Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. C., Boelens, P. G., Van Norren, K. and Van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition.*, 74: 418-425.

-O-

Odeigah, P.G. Makinwa, B.J and Oyeniya, R. (1997). Genotoxicity screening of leachates from solid industrial waste evaluated *Allium* test. *ATLA*.25:311-321.

Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, Iarmarcovai, G. and Botta, A. (2005). De la génotoxicologie à la biosurveillance. Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales 28, 25-28.

-P-

Pautasso, M., Aas, G., Queloz, V. and Holdenrieder, E. (2013). (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge. *Biological Conservation* 158, 37–49.

Pfeifer, G.P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem. Photobiol* , 65, 270-283.

Pincemail, J. Meurisse, M., Limet, R. and Defraigne, J. (1999). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires. *Medi-Sphere* ; 91: 33-6.

Pines, J. and Rieder CL. (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression, *Nat Cell Biol* 3: E3-6.

Pirbalouti, A., Hashemi, M. and Ghahfarokhi, F. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 48, 43-48.

Plewa, M.J, Wagner, E., Gentile, G. and Gentile, J. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutation Research* , 233-245.

Prouillac, C. (2006). Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action *in vitro*. Thèse, Université Paul Sabatier de TOULOUSE III: Toulouse. 58P.

Références Bibliographiques

-R-

Radi , S., Stipani ev, D.,Vuj i , V., Raj i , M.M., Širac, S. and Pevalek-Kozlina, B. (2010).The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test.*Science of the Total Environment* 408, 1228–1233.

Ragunathan, I. and Panneerselvam, N. (2007).Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*.Find out how to access preview-only content. University SCIENCE B. *Journal of Zhejiang*.

Rank, J. and Nielsen, M.H. (1994).Evaluation of the *Allium cepa* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater.*Mutation Research*, 312.P 17-24.

Rank, J., and Nielsen, M.H. (1997).*Allium cepa* anaphase telophase root tip chromosome aberration assay on Nmethyl Nnitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 390: 121127.

Rani, G., Kaur, K., Wadhwa, R., Kaul, S.C. and Nagpal, A. (2005). Evaluation of the anti-genotoxicity of leaf extract of Aschwagandha. *Food chemical Toxicology* 43.P95-98.

Ravanat, J.L., Douki, T. and Cadet, J. (2001)."Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components."*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63 (1-3): 88-102.

Rojas, M., Valverde, L., Vega, A., Salvador, P., Ramirez, L., Herrera, D., Watters, F., Lavin, P. and Ostrosky-Wegman. (1996). Genotoxic effects of bistratene A on human lymphocytes, *Mutat. Res.* 367,169–175.

Roshni, P.and Dawande, A.Y. (2010).Detection of potential carcinogens by Ames test.*Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 01: 57-64.

-S-

Safaa, Y., Zaki, M.L. and Michael, I. (2012). Digitonin synergistically enhance the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine*19 , 1307– 1314.

Saghrirzadeh, M., Gharaat, M.R., Mohammadi, Sh. and Ghiassi-Nejad, M. (2008). Evaluation of DNA damage in the root cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar-Iran. *Journal of Environmental Radioactivity* 99.P1698-1702.

Sakagami, M., Watanade, M, Hikosaka,K., and Shirakawa. (2005).Reward Expectancy-Related Prefrontal Neuronal Activities: Are They Neural Substrates of “Affective” Working Memory. Volume 43, Issue 1, Pages 53–64.

Références Bibliographiques

Salamone, J.D. (1994).The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav Brain Res.* (2):117-33.

Santoro, M., Zygadlo, J., Giordano, W. and Banchio, E. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 1177-1182.

Saxena, P.N., Gupta, S.K and Murthy, R.C. (2010). Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: A spectroscopic approach for chromosome damage. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96, 93–100.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30:3875-3883. in PMC will retrieve *Clinical microbiology review* ; 12(4): 564–582.

Schlegel, R., MacGregor, J.T. and Everson, R.B. (1986). Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Research* 46, 3717–3721.

Scopel, R., Falcão, A., Aline, M., Rafael, N., Almeida, H., Gandolfi, C., Rubem M. and Vargas, E. (2014). Supercritical Fluid Extraction from *Syzygium aromaticum* Buds: Phase Equilibrium, Mathematical Modeling and Antimicrobial Activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56, 1234-1244.

Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Kouda-Bonafos, M., Guinko, S., and Nacro M. (1995). Teneur en tanins des organes de quatre espèces de la famille des Anacardiaceae - Etudes Flor. Veg. BurkinaFaso. 2, 43-45.

Sharma, C.B.S.R. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Current Science*, 52: 10001002.

Sheikh, S.A., Wani, M.R., Lone, M.A., Tak, M.A. and Malla, N.A. (2012). Sodium Azide induced biological damage and variability for quantitative traits and protein content in wheat [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Plant Genomics* ISSN: 0976-8823. Volume 2, Issue 1, pp.-34-38.

Shrestha, H. (2004). A Plant Monograph on onion (*Allium cepa* L.). The School of Pharmaceutique and Biomedical Sciences, Pokhara University, Simalchaur, Pokhara, Nepal 90P.

Siddiqui, S., Meghvansi, M.K. and Hasan, Z. (2007). Cytogenetic changes induced by sodium azide (NaN₃) on *Trigonella foenum-graecum* L. seeds. *South African Journal of Botany* 73, 632–635.

Sifa, T. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research* 626.P4-14.

Sifa, T. (2008). Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Food and Chemical Toxicology*. 46 2035–2041.

Références Bibliographiques

Sifa, T. (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103, 224–230.

Skerget, M ., Kotnik, P ., Hadolin, M ., Hras, A-R ., Simonic, M . and Knez, Z. (2005).phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89:191-198.

Spigno, G., Tramelli, L., and De Faveri, D.M. (2007).Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food Engineering*, 81,200-208.

Stanislav, G., Kozmin, R. and Schaaper, M. (2007). Molybdenum cofactor-dependent resistance to *N*-hydroxylated base analogs in *Escherichia coli* is independent of MobA function. *Mutation Research* 619, 9–15.

Steven, J., Clifton, K., Ward, D and Ranner, S. (1997).The status of juniper *Juniperus communis* L. in northeast England. *Biological Conservation* 79, 67-77.

Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejja, G. (1983). Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutat. Res.*, 113, 117–133.

-T-

Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. and Kakde, R.(2008).Flavonoids as nutraceuticals.*Topical journal of pharmaceutical research.*,7 (3) : 1089-1099.

Tartar, A., Boucias, D.G., Becnel, J.J. and Adams, B.J., (2006). Comparison of plastid 16S rDNA (rrn16) genes from *Helicosporidium* spp.: evidence supporting the reclassification of *Helicosporidia* as green algae (Chlorophyta). *Evol.Microbiol.* 53, 1719–1723.

Tatiana, I., Stanislav, A. Geras'kin, I. Shuktomova, S, Anatoliy, I. and Taskaev.(2005). Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region.*Journal of Environmental Radioactivity* 80, 59–74.

Thomas, D., Pallard, M.E.P. and William, C. (2004).Biologie cellulaire, Edition coordination scientifique, ISBN 2-84299-57-6.

Timothy, O. M., Idu, D.I., Olorunfemi, O. and Ovuakporie-Uvo.(2014). Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv.*South African Journal of Botany* 91, 71–74.

Tiqwari, A. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases; Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science.*,81(9) : 1179-1181.

Références Bibliographiques

Tonon, G ., Capuana, A. and Marco, D. (2001).Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis.*Scientia Horticulturae* 87,291-301.

Toyokuni, S., Tanaka, Y., Hattori, Y., Nishiyama, A., Yoshida, K., Uchida, H., Hiai, H., Ochi and Osawa, T. (1997)."Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model." *Laboratory Investigation* 76: 365-374.

Tsai, T. H., Tsai, P. G. and Ho, S. (2004). Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used species. *Journal of food science.***70** (1): C93-C97.

Tshepiso, J., Makhafola, L.J., Jacobus, M. and Eloff, N. (2014).In vitro cytotoxicity and genotoxicity of five *Ochna* species (Ochnaceae) with excellent antibacterial activity. *South African Journal of Botany* 91, 9–13.

V-W-96

Vargas, V.M.F. Motta, V.E.P Leit, A.C and Henriques, J.A.P. (1990).Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureoides* in prokaryotic organisms. *Mutation Research*, 240, 13-18.

Veleminsky, J. and Gicher, T. (1988).Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutation Research*, 197,221-242.

Wallander, E. (2008).Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Syst. Evol.* 273, 25–49.

Wang, Z., Yang, L., Yujiao, S., and Qing Mou, B, (2014).Structural characterization of LbGp1 from the fruits of *Lycium barbarum* L. *Food Chemistry*, 159 137-142.

Woodhead, M., Mark, A., Rex Brennan, T., Ronnie, J., Mcnicol, H. and Davies, V. (1998).Cloning and characterisation of the cDNA clones of five genes that are differentially expressed during ripening in the fruit of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Plant Physiology* 153, 381-393.

Xiano, H., Wang, J.X., Wang, G., Wang, J.Y. and li, G.K. (2009). Evaluation of vacuum microwave assisted extraction technique for the extraction of antioxidants from plant samples. *journal of Chromatography A*, 1216, 8867-8873.

Références Bibliographiques

-Y-

Yan, L., David, H., Chen, J., Ying, C, Roberta A., Mittelstaedt, Y., Alexandru, S., Biris, R. and Heflich, T.(2012). Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research* 745, 4– 10.

Yi, H., Wu, L. and Jiang, L. (2007). Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. *Science of the Environment* ,383, P232-236.

Yildiz, M. and Arikan, E.S. (2008). Genotoxicity testing of quizalofod P-ethyle herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*, 61(1), 45-52.

Yıldız, M., Hakkı, C.I., Konuk, M., Fidan, A.F. and Terzi, H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere* 75, 934–938.

Yuet Ping, K., Darah, I. and Sasidharan, S. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of *Euphorbia hirta* in MCF-7 cell line model using comet assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.

Annexe N° 01 : Stades de divisions cellulaire des différents traitements + IM (%) à 18H

Traitement	Stade de division cellulaire à 18H					IM%
	Interphase	Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase	
Eau distillée	444.5±42.1	654.7±50.2	6.02±0.55	5.4± 0.48	9.8±0.88	0.61±0.01
%	40.09±5.96	59.04±5.34	0.55± 0.21	0.48± 0.32	0.88±0.23	61
DMSO	476.7±67.67	621.3±40.81	4.8±1.94	3.4±1.94	7.4±2.82	0.57±0.03
%	42.19±4.68	54.99±5.73	0.44±0.27	0.32±19	0.68±0.27	57
NaN3 25mg /L	469.5±47.46	580.0±44.23	1.6±0.92	–	–	0.55±0.02
%	44.13±5.30	54.49±5.41	0.15±0.11			55
NaN3 50mg/L	544.5±34.45	598.9±42.45	1.4±0.68	0.8±0.29	1.4±0.68	0.53±0.01
%	47.23± 6.98	51.95± 7.22	0.08±0.05	0.14±0.13	0.12±0.06	53
NaN3 100mg/L	725.0±34.36	398.3±32.01	1.8±1.11	1.1±0.63	2.8±1.01	0.36±0.02
%	64.05± 9.74	35.19±8.17	0.14±0.08	0.20±0.04	0.24±0.09	36
EE 50mg/L	560.9±22.45	636.3±42.01	11.0±2.16	7.6±1.43	6.4±1.46	0.55±0.01
%	45.09± 1.53	51.15± 1.44	2.11± 1.23	1.03±0.12	0.53±0.13	55
EE 100mg/L	547.7±36.94	487.2±23.54	2.4±0.50	3.2±1.59	8.4±2.72	0.50±0.01
%	50.30± 6.95	44.74± 6.88	1.54± 0.36	2.6±0.16	0.78±0.25	50
EE 300mg/L	593.8±24.54	468.7±36.81	4.2±2.13	5.6±2.13	7.8±2.26	0.45±0.04
%	54.63± 3.04	43.12± 2.94	0.35± 0.12	0.83±0.19	0.70± 0.20	45
EE 500mg/L	663.8±35.34	453.4±36.97	1.8±1.42	1.4±0.92	3.2±1.15	0.42±0.03
%	58.13± 8.35	39.71± 8.10	1.53±1.08	0.18±0.06	0.26±0.09	42
EF 50mg/L	470.0±45.87	533.0±57.84	6.8±1.07	10.0±3.35	8.0±1.32	0.55±0.04
%	45.56± 2.98	51.65± 2.89	0.89±0.13	1.00±0.14	0.83±0.25	55
EF 100mg/L	506.0±44.34	548.7±56.63	4.4±0.92	4.4±0.60	6.6±1.76	0.53±0.01
%	47.03± 2.89	50.90± 3.98	0.42± 0.09	0.71± 0.07	0.8±0.17	53
EF 300mg/L	531.6±52.65	484.3±43.65	3.8±1.26	2.4±0.47	8.0±1.32	0.49±0.02
%	51.52± 5.37	46.93±5.40	0.37± 0.12	0.38± 0.04	0.77±0.13	49
EF 500mg/L	685.4±53.76	503.0±54.53	0.8±0.46	0.6±0.31	0.6±0.31	0.44±0.01
%	56.23± 3.57	43.52±3.04	0.05± 0.03	0.07±0.02	0.04±0.02	44
AS+EE 50mg/L	602.0±43.76	466.8±42.53	0.2±0.15	0.2±0.15	0.3±0.12	0.44±0.02
%	56.27±2.53	43.63±2.54	0.01±0.01	0.03±0.01	0.01±0.01	44
AS+EE100mg/L	580.2±25.74	482.3±28.85	0.4±0.31	0.2±0.15	0.4±0.19	0.46±0.03
%	54.43± 1.71	45.25±1.69	0.03±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	46
AS+ EF50mg/L	853.1±53.98	236.6±53.32	2.4±1.90	–	0.6±0.47	0.23±0.01
%	77.07± 1.47	21.38± 1.37	1.4±1.11		0.05±0.04	23
AS+EF100mg/L	561.2±36.96	473.2±26.74	0.8±0.63	0.2±0.15	0.4±0.01	0.46±0.02
%	54.12± 3.51	45.64± 3.61	0.07±0.05	0.03±0.01	0.07±0.06	46

Annexe N° 02 : Stades de division cellulaire des différents traitements + IM (%) à 24H

Traitement	Stade de division cellulaire à 24H					IM%
	Interphase	Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase	
Eau distillée %	378.8±43.2 36.85±3.86	627.7±45±11 61.07±6.63	8.2±1.17 0.78±0.17	5.2±0.9 0.5±0.07	4.2±0.13 0.40±0.05	0.63±0.04 63
DMSO %	424.5±34.21 38.04±4.68	680.6±56.01 60.99±5.73	4.8±2.74 0.23±0.11	2.6±1.54 0.22±0.13	5.6±3.42 0.48±0.30	0.62±0.01 62
NaN3 25mg /L %	526.4±45.56 47.13±5.30	586.3±42.12 52.49±5.41	1.16±0.01 0.01±0.01	–	1.22±0.13 0.03±0.01	0.53±0.02 53
NaN3 50mg/L %	564.6±46.3 52.23± 6.98	507.5±23.12 46.95± 7.22	0.6±0.05 0.16±0.08	0.4±0.07 0.11±0.05	7.0±0.68 0.11±0.07	0.48±0.02 48
NaN3 100mg/L %	820.9±16 70.05± 9.74	342.1±23.1 29.19±8.17	2.0±1.03 0.16±0.08	1.1±0.67 0.16±0.05	1.6±0.87 0.13±0.07	0.30±0.01 30
EE 50 mg/L %	505.7±24.42 47.49± 1.53	534.0±54.12 50.15± 1.44	3.0±0.90 0.37± 0.09	2.6±0.53 0.73±0.05	7.2±0.80 0.78±0.19	0.53±0.02 53
EE 100 mg/L %	609.8±26.89 52.30± 6.95	533.3±33.14 45.74± 6.88	0.4±0.33 1.17± 0.36	0.6±0.50 0.04±0.16	1.4±0.73 0.12±0.06	0.47±0.02 47
EE 300 mg/L %	617.7±85.0 57.63± 3.04	440.8±43.16 41.12± 2.94	5.2±2.13 0.55± 0.12	5.4±2.20 0.28±0.05	8.4±1.95 0.28± 0.05	0.43±0.01 43
EE 500 mg/L %	647.6±67.16 62.33± 8.35	371.0±12.99 35.71± 8.10	3.4±0.92 0.34±0.08	3.4±0.99 0.47±0.05	0.8±0.46 0.83±0.11	0.38±0.02 38
EF 50 mg/L %	478.4±23.12 46.36± 2.98	522.7±42.97 50.65± 2.89	12.4±3.07 0.65±0.09	10.4±2.36 1.58±0.30	8.2±2.34 0.78±0.05	0.54±0.01 54
EF 100 mg/L %	526.7±19.96 47.03± 2.89	570.08±56.3 50.90± 3.98	5.4±0.92 0.43± 0.10	5.3±1.60 0.76± 0.16	2.6±1.76 0.17±0.06	0.52±0.03 52
EF 300 mg/L %	618.8± 61.1 56.52± 5.37	459.1±44.18 41.93±5.40	4.8±2.06 0.42± 0.19	1.8±0.88 0.17± 0.08	1.4±0.53 0.75±0.22	0.44±0.04 44
EF 500 mg/L %	627.7±26.44 58.23± 3.57	436.8±36.63 40.52±3.04	0.8±0.46 0.14± 0.06	0.6±0.31 0.4±0.09	0.6±0.31 0.11±0.05	0.41±0.01 41
AS+EE 50 mg/L %	597.4±45.67 55.27±2.53	482.4±48.1 44.63±2.54	0.2±0.16 0.02±0.01	0.4±0.31 0.03±0.01	0.6±0.31 0.01±0.01	0.45±0.04 45
AS+EE100mg/L %	572.7±53.87 53.43± 1.71	495.8±33.43 46.25±1.69	0.6±0.31 0.03±0.02	–	0.4±0.17 0.03±0.01	0.47±0.01 47
AS+ EF50 mg/L %	735.8±66.23 66.47± 1.47	369.5±26.3 33.38± 1.37	–	–	0.3±0.01 0.04±0.01	0.34±0.02 34
AS+EF100mg/L %	581.16±49.4 53.12± 3.51	510.7±48.34 46.64± 3.61	0.4±0.19 0.05±0.02	0.2±0.15 0.04±0.01	0.6±0.47 0.23±0.04	0.47±0.01 47

Annexe N° 03 : Stades de divisions cellulaire des différents traitements + IM (%) à 48H

Traitement	Stade de division cellulaire à 48H (3eme prélèvement)					IM%
	Interphase	Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase	
Eau distillée	258.1±22.9	743.3±59.4	8.4±1.99	11.8± 0.43	13.8±1.89	0.75±0.01
%	25.01±2.06	72.03±8.35	0.83± 0.32	1.14± 0.32	1.33±0.13	75
DMSO	344.0±27.57	682.0±39.11	2.2±1.63	1.0±0.33	1.8±1.31	0.66±0.03
%	32.99±6.68	65.39±7.09	0.21±0.21	0.15±0.10	0.17±0.13	66
Na3 25mg /L	537.1±47.6	574.6±24.13	1.6±0.92	1.4±0.58	2.2±0.88	0.52±0.02
%	48.13±5.30	51.49±6.44	0.13±0.07	0.12±0.05	0.19±0.07	52
Na3 50mg/L	581.3±32.49	486.1±42.45	1.6±0.77	1.2±0.21	1.0±0.25	0.46±0.01
%	54.23± 6.98	45.35± 3.22	0.15±0.07	0.11±0.13	0.09±0.04	46
Na3 100mg/L	804.6±34.31	339.3±32.01	–	1.6±0.33	1.1±0.51	0.30±0.02
%	70.05± 9.74	29.59±1.07		0.15±0.03	0.1±0.04	30
EE 50 mg/L	559.2±32.45	528.2±42.01	6.8±1.83	3.2±1.26	8.4±1.42	0.51±0.01
%	51.69± 1.53	48.15± 2.13	1.53± 1.03	0.50±0.12	0.79±0.20	51
EE 100 mg/L	629.5±46.94	443.1±23.54	3.6±0.43	3.2±0.98	3.2±1.96	0.42±0.01
%	57.39± 6.95	40.4± 3.98	0.34± 0.03	0.48±0.08	0.78±0.20	42
EE 300 mg/L	639.5±34.04	407.8±36.81	5.8±1.40	5.6±1.47	7.2±1.96	0.41±0.04
%	61.03± 3.04	38.92± 3.94	0.55± 0.13	0.83±0.19	0.68± 0.20	41
EE 500 mg/L	690.9±45.4	401.9±36.97	–	0.2±0.15	1.8±0.95	0.37±0.03
%	63.10± 8.35	36.71± 4.12		0.04±0.01	0.10±0.08	37
EF 50 mg/L	569.9±55.17	511.8±57.84	12.4±3.65	10.4±2.35	8.2±2.32	0.51±0.04
%	52.34± 2.98	47.25± 3.79	1.13±0.33	1.56±0.20	0.74±0.25	51
EF 100 mg/L	570.8±42.04	495.9±56.63	11.8±4.02	5.4±1.60	6.6±2.76	0.53±0.01
%	53.43± 2.89	46.48± 4.38	1.11± 0.38	0.85± 0.16	0.56±0.26	49
EF 300 mg/L	662.0±62.6	396.3±43.65	8.4±2.26	6.2±1.17	8.2±2.32	0.40±0.02
%	62.52± 5.37	37.43±2.49	0.80± 0.11	0.97± 0.14	0.77±0.03	40
EF 500 mg/L	610.0±41.76	472.1±54.53	0.6±0.33	0.2±0.16	3.6±2.31	0.37±0.01
%	56.23± 3.57	43.52±2.04	0.05± 0.02	0.03±0.01	0.30±0.12	37
AS+EE 50 mg/L	629.9±53.66	506.6±42.53	0.2±0.15	–	0.2±0.15	0.43±0.02
%	57.07±2.53	42.65±5.50	0.01±0.01		0.01±0.01	43
AS+EE100mg/L	593.9±45.04	518.0±28.85	–	0.6±0.47	0.2±0.15	0.47±0.03
%	53.03± 1.71	46.25±1.65		0.09±0.04	0.01±0.01	47
AS+ EF50 mg/L	633.4±55.90	473.7±53.32	–	0.4±0.31	0.2±0.15	0.43±0.01
%	57.07± 1.47	42.68± 4.36		0.06±0.03	0.05±0.04	43
AS+EF100mg/L	577.8±35.90	622.3±26.74	0.4±0.63	0.4±0.19	0.2±0.01	0.48±0.02
%	52.10± 3.51	47.84± 2.65	0.05±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	48

Annexe N° 04 : Stades de divisions cellulaire des différents traitements + IM (%) à 72H

Traitement	Stade de division cellulaire à 72H					IM%
	Interphase	Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase	
Eau distillée	281.8±12.5	826.3±52.0	14.07±0.55	7.8± 0.48	6.6±0.88	0.77±0.01
%	25.39±3.96	74.45±6.31	1.26± 0.21	0.70± 0.32	0.59±0.23	77
DMSO	314.0±51.67	746.9±40.81	1.6±1.10	1.6±0.77	1.6±0.14	0.71±0.03
%	29.6±2.68	70.4±8.70	0.14±0.27	0.32±19	0.14±0.07	71
Na3 25mg /L	603.6±67.4	575.0±44.23	8.8±3.02	2.8±0.80	3.8±1.77	0.50±0.02
%	51.11±5.30	48.69±4.99	0.6±0.23	0.22±0.06	0.33±0.13	50
Na3 50mg/L	648.5±39.55	428.9±42.45	1.66±0.66	3.5±0.05	0.83±0.05	0.40±0.01
%	60.22± 6.18	39.65± 2.22	0.11±0.09	0.04±0.01	0.07±0.05	40
Na3 100mg/L	825.2±34.60	231.8±32.01	0.2±0.16	0.2±0.16	—	0.22±0.02
%	78.02± 9.34	21.89±4.97	0.01±0.01	0.01±0.01		22
EE 50 mg/L	615.7±42.15	456.3±42.01	6.0±1.16	5.0±1.59	11.4±2.88	0.45±0.01
%	57.39± 5.53	42.53± 3.43	0.11± 0.01	0.77±0.14	1.53±0.26	45
EE 100 mg/L	687.4±56.94	451.2±23.54	3.8±0.86	3.8±0.94	4.6±1.72	0.41±0.01
%	60.30± 6.43	39.64± 3.80	0.33± 0.07	0.57±0.09	0.40±0.14	41
EE 300 mg/L	717.5±44.14	381.7±36.81	6.6±1.13	5.8±1.15	6.4±1.36	0.38±0.04
%	65.23± 7.04	34.72± 5.14	1.86± 0.96	0.85±0.09	0.56± 0.10	38
EE 500 mg/L	755.6±55.74	319.4±36.97	2.6±0.73	—	0.2±0.15	0.30±0.03
%	70.23± 8.85	29.71± 1.10	0.22±0.07		0.01±0.01	30
EF 50 mg/L	554.7±45.87	532.0±57.84	3.4±0.77	—	7.6±2.46	0.49±0.04
%	51.56± 5.98	48.02± 3.19	0.30±0.07		0.68±0.22	49
EF 100 mg/L	599.8±42.84	465.1±56.63	6.6±1.92	11.8±2.81	4.2±1.31	0.46±0.01
%	55.03± 6.19	44.90± 4.18	0.62± 0.20	0.05± 0.01	0.38±0.12	46
EF 300 mg/L	650.8±50.65	384.6±43.65	6.2±1.32	6.2±1.76	11.2±2.95	0.39±0.02
%	62.82± 7.37	37.13±5.40	0.59± 0.12	0.16± 0.05	1.07±0.29	39
EF 500 mg/L	779.4±63.36	383.3±54.53	3.00±0.66	3.6±0.89	2.8±0.71	0.34±0.01
%	66.93± 8.27	33.02±3.04	0.25± 0.05	0.51±0.07	0.24±0.06	34
AS+EE 50 mg/L	665.7±63.11	540.3±42.53	0.25±0.17	0.25±0.17	0.50±0.20	0.45±0.02
%	55.07±2.63	44.69±4.54	0.02±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	45
AS+EE100mg/L	559.3±35.79	534.4±28.85	1.0±0.61	0.2±0.15	0.2±0.19	0.49±0.03
%	51.13± 5.41	48.85±1.99	0.08±0.01	0.03±0.01	0.01±0.01	49
AS+ EF50 mg/L	635.5±50.98	539.6±53.32	0.4±0.19	—	0.6±0.31	0.46±0.01
%	54.04± 4.49	45.88± 6.30	0.01±0.01		0.05±0.02	46
AS+EF100mg/L	564.4±35.98	559.0±26.74	1.20±0.68	0.6±0.34	0.8±0.06	0.50±0.02
%	50.22± 3.51	49.74± 3.61	0.10±0.05	0.09±0.03	0.07±0.02	50

Annexe N° 05 : Types d'aberrations + % des cellules aberrantes à 18H.

traitement	Types d'anomalies chromosomiques (18H)					IM%
	CM	MP	AP	cassure	pont	
Eau distillée %	–	–	–	–	–	–
DMSO %	–	–	–	–	–	–
NaN3 25mg /L %	2.25± 1.44 0.16±0.09		0.12± 0.12 0.02± 0.01	–	–	0.21
NaN3 50mg/L %	2.75± 0.06 1.01± 0.05	1.37± 0.30 0.4± 0.05	0.12± 0.02 0.1±0.08	–	–	1.51
NaN3 100mg/L %	50.14±15.39 4.39± 1.33	2.57± 1,43 0.40± 0.12	0.4± 0.2 0.03± 0.01	–	0.14± 0.14 0.01± 0.01	4.83
EE 50 mg/L %	23.62± 5.18 1.08± 0.39	1.87± 0.83 0.09± 0.07	0.62± 0.26 0.02± 0.01	–	–	1.19
EE 100 mg/L %	16.37± 2.8 1.0± 0.03	1.5± 0.99 0.3± 0,17	0.55± 0.73 0.06± 0.06	0.27± 0.39 0.05± 0.03	–	1.48
EE 300 mg/L %	16.75± 4.81 1.89± 0.4	3.12± 1.71 0.3± 0.14	0.37± 0.26 0.06± 0.02	–	–	2.29
EE 500 mg/L %	19.71± 4.66 1.96± 0,45	0.41± 0.18 0.40± 0.01	0.14± 0.13 0.02± 0.01	–	–	2.38
EF 50 mg/L %	2.87± 1.76 0.91± 0.16	1± 0.50 0.09± 0.04	0,62± 0.26 0.05± 0.02	0.5± 0.26 0.04± 0.02	–	1.09
EF 100 mg/L %	2.25± 1.24 0.84± 0.23	0.62± 0.49 0.37± 0.04	0.27± 0.19 0.21± 0.02	1.02± 0.87 0.19± 0.08	–	1.8
EF 300 mg/L %	2.45± 1.11 0.99± 0.20	1.12± 1.74 0.20± 0.16	0.87± 0.09 0.03± 0.01	0.75± 0.31 0.02± 0.03	–	1.24
EF 500 mg/L %	14.62± 7,82 1.64± 0.70	1.62± 0,65 0.14±0.06	1.12± 0.55 0.10± 0.05	0.25± 0.25 0.02± 0.02	–	1.9
AS+EE 50 mg/L %	25.33± 4.93 3.43± 0.45	1.16± 0.72 0.1± 0.06	0.16± 0.14 0.01± 0.01	0.16± 0.14 0.01± 0.01	–	3.55
AS+EE100mg/L %	14.0± 2.41 2.75± 0.22	0.28± 0.17 0.02± 0.01	0.14± 0.13 0.01± 0.01	–	–	2.78
AS+ EF50 mg/L %	15.12± 2.68 2.89± 2.67	0.37± 0.17 0.37± 0.04	–	0.12± 0.12 0.02± 0.01	–	3.28
AS+EF100mg/L %	13.01± 2.73 2.23± 0.26	0.14± 0.13 0.01± 0.01	0.28± 0.17 0.02± 0.01	0.28± 0.26 0.02± 0.01	–	2.28

Annexe N° 06 : Types d'aberrations + % des cellules aberrantes à 24H.

traitement	Types d'anomalies chromosomiques (24H)					IM%
	CM	MP	AP	cassure	pont	
Eau distillée %	–	–	–	–	–	–
DMSO %	–	–	–	–	–	–
NaN3 25mg /l %	10.3± 6.55 0.29±0.12	0.25±0.13 0.02±0.01	– –	–	–	0.31
NaN3 50mg/l %	25.1± 3.81 1.19± 0.07	15.57± 4.84 0.42± 0.15	0.25± 0.25 0.02±0.02	–	–	1.63
NaN3 100mg/l %	53.14±8.35 4.58± 1.7	0.57± 0.36 0.05± 0.03	0.14± 0.14 0.01± 0.01	–	–	4.64
EE 50 %	19.75±5.27 1.07± 0.4	0.77± 0.06 0.06± 0.04	0.15± 0.02 0.01± 0.01	0.15±0.03 0.01±0.01	–	1.15
EE 100 %	25.14±5.08 2.11± 0.46	0.57± 0.07 0.05± 0.04	0.57± 0.41 0.02± 0.01	–	0.11±0.09 0.01±0.01	2.19
EE 300 %	24.01±3.30 2.25± 0.31	1.62± 0.90 0.14± 0.08	1.07± 0.66 0.07± 0.06	0.37± 0.26 0.03± 0.02	–	2.49
EE 500 %	28.57±5.15 2.03± 0.63	2.57± 0.60 0.46± 0.05	1.96± 0.54 0.20± 0.04	1.99±0.67 0.20±0.06	–	2.89
EF 50 %	13.0± 3.26 1.17± 0.25	2.5± 1.48 0.22± 0.12	1.37± 0.26 0.12± 0.02	0.62± 0.12 0.06± 0.01	–	1.47
EF 100 %	18.2± 2.12 1.72± 0.19	1.25± 0.56 0.10± 0.04	0.75± 0.41 0.03± 0.01	0,21± 0.09 0.02± 0.01	–	1.87
EF 300 %	24.7± 2.54 1.81± 0.18	1.31±0.03 0.11±0.06	1.62± 1.32 0.05± 0.02	0.17± 0.09 0.01± 0.01	–	1.98
EF 500 %	14.12±3.51 1.28± 0.31	13.25± 0.99 1.14±0.06	0.75± 0.48 0.06± 0.04	0.16±0.14 0.01±0.01	–	2.49
AS+EE 50 %	36.83±1.44 2.62± 0.13	16.03±4.23 0.90±0.23	–	0,16± 0,14 0.03± 0.01	–	3.55
AS+EE 100 %	35.4± 1.70 2.49± 0.16	2.85± 0,51 0.19± 0.05	0.42± 0.27 0.04± 0.02	0.75±0.18 0.06±0.01	–	2.78
AS+ EF50 %	45.12±2.78 3.14± 1.23	0.97± 0.37 0.08± 0.03	–	0.75± 0.12 0.06± 0.02	–	3.28
AS+EF100 %	28,8± 1.68 2.28± 0.15	0.75± 0.17 0.06± 0.01	0.21± 0.13 0.02± 0.01	0.21± 0.18 0.02± 0.01	–	2.28

Annexe N° 07 : Types d'aberrations + % des cellules aberrantes à 48H.

traitement	Types d'anomalies chromosomiques (48H)					IM%
	CM	MP	AP	cassure	pont	
Eau distillée %	-	-	-	-	-	-
DMSO %	-	-	-	-	-	-
NaN3 25mg /L %	-	1.12±0.44 0.13±0.03	0.12±0.12 0.07±0.01	-	-	0.7
NaN3 50mg/L %	1.14± 0.83 1.99± 0.06	7.14± 0.77 0.62± 0.22	0.57± 0.57 0.15±0.05	-	-	2.76
NaN3 100mg/L %	34.83±19.19 4.97± 1.54	-	-	-	-	4.97
EE 50 mg/L %	36.37±6.08 1.35± 0.54	9.5± 1.99 0.67± 0.17	2.5± 0.73 0.03± 0.06	0.87±0.39 0.08±0.03	-	2.13
EE 100 mg/L %	26.71±6.83 2.07± 0.64	3.14± 1.88 0.17± 0.16	3.57± 1.39 0.02± 0.12	0.85±0.46 0.07±0.04	-	2.33
EE 300 mg/L %	16.5±4.68 1.96± 0.45	2.87± 0.97 0.27± 0.09	1.75± 0.31 0.06± 0.02	-	-	2,29
EE 500 mg/L %	4.12±2.66 1.93± 0.24	0.12± 0.12 1.01± 0.01	-	-	-	2,94
EF 50 mg/L %	13.62± 3.62 1.27± 0.34	2.5± 1.02 0.22± 0.08	1.25± 0.56 0.11± 0.05	0.62± 0.49 0.05± 0.04	-	1.65
EF 100 mg/L %	7.42± 2.35 1.29± 0.21	1.42± 0.57 0.10± 0.05	2.57± 0.53 0.04± 0.14	0.28± 0.17 0.07± 0.04	-	1.50
EF 300 mg/L %	9.37± 1.92 1.09± 0.18	3.37±0.68 0.31±0.06	1.12± 1.61 0.10± 0.05	1.62± 0.32 0.06± 0.03	-	1.65
EF 500 mg/L %	21.71±5.94 1.97± 0.5	3.57± 1.30 0.33±0.12	2.28± 0.84 0.15± 0.08	0.71±0.28 0.06±0.02	-	2.49
AS+EE 50 mg/L %	0.66±0.57 2.05± 0.05	0.16±0.14 0.01±0.01	-	0.16± 0.14 0.01± 0.01	-	2.07
AS+EE100mg/L %	1.42± 0.91 0.43± 0.09	-	-	-	-	1.43
AS+ EF50 mg/L %	15,12±4,36 2,37± 0,41	1.12± 0.74 0.03± 0.02	-	0.25± 0.25 0.02± 0.02	-	2.42
AS+EF100mg/L %	2.62± 0.98 0.3± 0.07	0.25± 0.16 0.12± 0.01	-	-	-	1.42

Annexe N° 08 : Types d'aberrations + % des cellules aberrantes à 72H.

traitement	Types d'anomalies chromosomiques (72H)					IM%
	CM	MP	AP	cassure	pont	
Eau distillée %	-	-	-	-	-	-
DMSO %	-	-	-	-	-	-
NaN3 25mg /L %	-	4.62±1.78 0.39±0.15	-	0.12±0.12 0.02±0.01	-	0.41
NaN3 50mg/L %	19.85± 1.85 1.89± 0.08	15.42± 1.92 1.15± 0.14	-	0.18±0.14 0.05±0.01	-	2.99
NaN3 100mg/L %	59.16±28.06 5.67± 2.65	1.83±1.34 0.17±0.13	-	-	-	5.84
EE 50 mg/L %	35.5±5.86 2.11± 0.49	10.75± 1.93 0.14± 0.16	2.37± 0.94 0.07± 0.02	1.06±0.03 0.01±0.01	-	2.33
EE 100 mg/L %	26.57±6.12 1.97± 0.51	2.28± 1.39 0.21± 0.12	3.42± 0.94 0.01± 0.01	3.14±1.22 0.08±0.01	-	2.27
EE 300 mg/L %	21.12±3.70 1.87± 0.30	4.75± 0.75 0.31± 0.06	1.25± 0.45 0.21± 0.04	0.12±0.12 0.09±0.01	-	2.48
EE 500 mg/L %	11.5±5.14 1.97± 0.48	2.75± 0.99 0.79± 0.09	-	0.5±0.37 0.06±0.03	-	2.82
EF 50 mg/L %	16.42± 5.58 1.51± 0.52	3.42± 1.11 0.31± 0.10	0.85± 0.43 0.07± 0.04	-	-	1.89
EF 100 mg/L %	7.37± 2.35 0.99± 0.22	3.25± 0.82 0.29± 0.07	1.02± 0.37 0.07± 0.03	0.5± 0.26 0.04± 0.02	-	1.39
EF 300 mg/L %	11.14± 1.82 1.07± 0.17	4.57±1.21 0.44±0.11	0.42± 0.52 0.14± 0.05	0.28± 0.28 0.02± 0.02	-	1.67
EF 500 mg/L %	13.62±2.52 1.95± 0.21	2.5± 0.94 0.41±0.08	1.01± 0.5 0.18± 0.04	0.5±0.32 0.04±0.02	-	2.58
AS+EE 50 mg/L %	4.16±0.98 1.54± 0.17	0.5±0.29 0.14±0.02	-	0.16± 0.14 0.01± 0.01	-	2.09
AS+EE100mg/L %	9.5± 1.4 1.86± 0.12	0.62±0.37 0.05±0.03	-	0.12±0.12 0.01±0.01	-	1.92
AS+ EF50 mg/L %	7.5±3.78 0.91± 0.33	0.5± 0.5 0.04± 0.04	0.12±0.12 0.01±0.01	0.5± 0.37 0.04± 0.03	-	2.00
AS+EF100mg/L %	5.28± 1.64 1.37± 0.15	0.42± 0.30 0.04± 0.02	-	-	-	1.41

Résumé :

Fraxinus angustifolia, une espèce très répandue dans les régions méditerranéennes, voir l'Algérie et le Maroc, qualifiée de plante médicinale pour son pouvoir de guérison de plusieurs maladies tel que la goutte et l'arthrite. Le but de cette étude est l'évaluation des effets génotoxique/antigénotoxique de ses extraits éthanoliques de feuilles et de l'écorce, en utilisant le test de génotoxicité *Allium cepa*. Différentes concentrations de ces extraits ont été appliquées ; 50mg/L, 100mg/L, 300mg/L et 500mg/L pour une évaluation génotoxique de la plante. Un traitement combiné des racines de *Allium cepa* par d'azide de sodium 100mg/L et différentes concentrations des extraits (50 et 100mg/L) a permis l'évaluation de son pouvoir antigénotoxique. La mesure des racines le calcul des indices mitotiques et le dénombrement des aberrations sont les paramètres principaux de cette expérimentation, ceci en fonction du temps d'incubation avec les différents traitements (18H, 24H, 48H et 72H), ces traitements ont été comparés au contrôle positif (Azide de sodium) et aux contrôles négatifs (Eau distillée, DMSO <0,1%).

D'après l'observation microscopique et le calcul de l'indice mitotique, l'azide de sodium a induit des aberrations chromosomiques et un déclin dans l'indice mitotique, ceci en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Les extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont marqué un effet cytotoxique et génotoxique faible lors du traitement avec les concentrations faibles (50mg/L, 100mg/L) et un effet génotoxique et cytotoxique plus marqué lors du traitement avec des concentrations plus élevées (300mg/L et 500mg/L), avec des effets visibles pour les plus longues périodes d'incubation (48H et 72H).

Par contre le traitement combiné par l'azide de sodium et les extraits de l'écorce et des feuilles a montré un potentiel antigénotoxique, selon le temps d'incubation et la dose de l'extrait, contre les effets de l'azide de sodium à 100mg/L.

Mots clés : *F.angustifolia*, *Allium cepa*, indice mitotique, aberrations chromosomiques, azide de sodium.

Abstract :

Fraxinus angustifolia is a widespread species in the Mediterranean region, mainly Algeria and Morocco. It is described as a medicinal plant for its healing power of several diseases such as gout and arthritis. The aim of this study is the evaluation of genotoxic / antigenotoxic effects of its leaves and bark ethanol extracts, via eukaryote species model *Allium cepa* root cells. Different concentrations of the extracts were applied: 50mg / L, 100mg / L, 300mg / L and 500mg / L for evaluating the genotoxic effect of this plant. A combined treatment by sodium azide 100mg / L and different concentrations of the extracts (50 and 100 mg / L) has allowed the evaluation of the antigenotoxic effect. *Allium cepa* root growth measurements and the mitotic index scoring aberrations are the main parameters of this experiment, as a function of incubation time with the different treatments (18H, 24H, 48H and 72H), compared to positive controls (sodium azide) and negative controls (distilled water, DMSO <0.1%).

According to microscopic observation and calculating the mitotic index, sodium azide induced chromosomal aberrations and a decline in the mitotic index, in dose and exposure time dependent manner. *Fraxinus angustifolia* leaves and bark extracts marked a low cytotoxic and genotoxic effects during treatment with lower doses (50mg / L, 100mg / L) and more marked genotoxic and cytotoxic effects during treatment with higher doses (300mg / L and 500mg / L) and longer time exposure (48H and 24H).

Combined treatment by sodium azide and plant extracts showed antigenotoxic potential according to the incubation time and extracts doses against induced damages of sodium azide (100mg /L).

Key words: *Fraxinus angustifolia*, *Allium cepa*, mitotic index, chromosomal aberrations, sodium azide.