

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

**Evaluation des effets de l'extrait par décoction de
feuilles *Fraxinus angustifolia* sur la toxicité induite
par le cyclophosphamide chez la souris**

Présenté par :

ABBAS Dania & KHOULALENE Farah

Soutenu le : 16/06/2016 à 11h00

Devant le jury composé de :

M^r. BRIBI. N

MAA President

M^r. ATMANI. D

Pr Encadreur

M^r. BASLI. A

MCB Examineur

Année Universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Ce mémoire de Master est le résultat d'un travail de recherche de plusieurs mois. En préambule, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir permis de débiter et de finir ce travail dans de bonnes conditions.

On tient aussi à mentionner le plaisir que nous avons eu à travailler au sein du laboratoire de recherche de biochimie appliquée, et nous en remercions ici madame Dina ATMANI qui nous a donné l'accès, à monsieur Djebbar ATMANI pour son encadrement et son conseil scientifique avisé. Grands remerciements à, notre tutrice mademoiselle Karima AYOUNI, de nous avoir accompagné durant l'élaboration et surtout la rédaction de ce mémoire et pour le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer. Nos profond remerciements vont également pour Ghania BOUGHLLID, qui nous a fait part de son expérience et de sa présence et d'avoir accepté de répondre à nos questions avec gentillesse.

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

Nos plus amples remerciements à madame Meriem RAHMANI-BERBOUCHA pour son soutien durant la réalisation de ce travail.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner monsieur RAMDANI et madame OUTHAH.A ingénieur du laboratoire de zoologie de nous avoir ouvert les portes du laboratoire.

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 Hamid qui a consacré sa vie pour me rapporter tout le confort dont

J'avais besoin pour avancer dans mes études,

A ma très chère mère Naima qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne,

Pour son dévouement afin d'assurer mon éducation et pour tous ses conseils

Précieux,

A ma petite très chère sœur : Thiziri,

A mes très chère grand frère: Massinissa et Koussaila,

A mes chère petit frère: Gaya et Abbas

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 Farah

DANIA

Dédicace

A papa et à maman que j'aime beaucoup

A mon cher et unique frère Tahar

A ma très chère sœur Habiba pour son aide précieuse

A mes amies plus particulièrement: Dania, Fella, Yahia, Sarah, Billal, Souad

Layachi, Sylia et Mustapha

A mes très nombreux cousins sans citer de noms ainsi qu'à toute ma famille

A toutes les mains qui m'ont été tendues....

FARAH

Liste des abréviations

AC : Aberration Chromosomique

CDK: Cyclin-dependent kinase

CMC: Carboxymethyl cellulose

Cox2: Cyclo-oxygénase

CP: Cyclophosphamide

F.angustifolia: *Fraxinus angustifolia*

G1: Gap1

G2: Gap2

IM: Indice Mitotique

M: Mitose

MDM 2: Murine Double Minute 2

NMRI: Naval Medical Research Institute

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Domages de l'ADN	03
02	La structure de la cisplatine	05
03	Structure du gaz moutarde ou ypérite	05
04	Structure de méchloréthamine	06
05	Réaction d'alkylation sur N7-guanineet formation des cross-links par les moutardes à l'azote	07
06	Structure de cyclophosphamide	07
07	Le mécanisme d'action du cyclophosphamide au sein des cellules	09
08	Schéma du métabolisme de cyclophosphamide	11
09	Structure de la coumarine	14
10	la structure chimique de quelques secoiridoïdes	15
11	Structure chimique des lignanes de <i>Fraxinus angustifolia</i>	15
12	Structure chimique des flavonoïdes	16
13	Photographies originales de l'arbre (A) et des feuilles (B) de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	19
14	Photographies originales des souris utilisées en expérimentation	20
15	Sacrifice des souris (A), prélèvement des fémurs (B) et extraction de la moelle osseuse (C).	23
16	Fixation sur lames (A), coloration (B) et observation microscopique (C)	24
17	Indices mitotiques et pourcentage des cellules aberrantes chez les lots contrôles négatif CMC (0.8%) et positifs CP (50mg/kg).	26
18	Photographies originales des aberrations détectées chez les lots contrôles négatif et positif.	28
19	l'IM et pourcentage des cellules aberrantes chez les lots contrôle et l'extrait a différentes doses	29
20	Photographies originales des aberrations détectées chez les lots traités avec les extraits	31
21	Indices mitotiques et pourcentage des cellules aberrantes chez les lots d'antigénotoxicité	33
22	Photographies originales des aberrations détectées chez les lots antigénotoxicité	36

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Aberrations chromosomiques détectées chez les lots contrôles négatif et positif.	27
II	Aberrations chromosomiques dans les lots contrôles négatif et positif comparativement aux extraits	32
III	Aberrations chromosomiques dans les lots antigénotoxicité	35

SOMMAIRE

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1- Division cellulaire.....	2
I.1.1- Les phases du cycle de division cellulaire	2
I.1.2- Contrôle du cycle cellulaire	2
I.1.3- Les inhibiteurs pharmacologiques du cycle cellulaire.....	3
I.2- Les agents alkylant	4
I.2.1- Les nitroso-urées.....	5
I.2.2- Les sels de platine.....	5
I.2.3- Les moutardes a l'azotés.....	5
I.2.3.1-Les mechlorethamine.....	6
I.2.3.2- Le Cyclophosphamide	7
I.2.3.2.1- La pharmacocinetique du cyclophoshamide.....	9
I. 3- Phytothérapie et plantes médicinales.....	12
I.3.1- <i>Fraxinus angustifolia</i>	12
I.3.1.1-Vertus et utilisation en médecine.....	13
I.3.1.2- Les composants phytochimiques	14
I.3.1.2.1- Les coumarines	14
I.3.1.2.2- Les secoiridoides	14
I.3.1.2.3 - Les lignanes et lignines.....	15
I.3.1.2.4-Les flavonoïdes.....	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1- Matériels	19
II.1.1- Matériel végétal.....	19
II.1.2- Les animaux de laboratoire	19

II.2 Méthodes	20
II.2.1- Préparation de la décoction de <i>Fraxinus angustifolia</i>	20
II.2.2- Evaluation de la génotoxicité de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	21
II.2.2.1-Les traitements des animaux	21
II.2.2.2- Sacrifice des souris, prélèvement des fémurs et extraction de la moelle osseuse	22
II.2.2.3- Fixation sur les lames, coloration et observations microscopiques	23
II.2.2.4- Analyse microscopique et dénombrement des aberrations	24
II.2.2.5-Analyse statistique.....	25

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1- Résultats de l'extraction.....	26
III.2- Induction de la génotoxicité par le cyclophosphamide.....	26
III.3- Evaluation de la génotoxicité de la décoction des feuilles de <i>F.angustifolia</i>	29
III.4-Evaluation de l'effet de la décoction sur la génotoxicité induite par le cyclophosphamide..	33
III.5- Discussion des résultats	37
Conclusion.....	41
Références bibliographiques	42
Annexes.....	52

Introduction

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. Les plantes médicinales constituent un élément important du patrimoine culturel et aussi un moyen financier limité face aux produits conventionnels (**Mpondo et al., 2012**).

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**). Ce qui peut remédié au risque que présentent la médecine moderne est surtout la thérapie chimique contre l'équilibre de la santé de l'Homme, par ses effets secondaires dont résultent d'autres maladies (**Svoboda, 2000**).

Beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui deviennent d'avantage une source potentielle de molécules naturelles bioactives, essentiellement des métabolites secondaires, à savoir les composés phénoliques, qui font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro* (**Gonçalves et al, 2013 ; Kardong et al., 2013**).

Dans le cadre de ce travail le choix a été porté sur *Fraxinus angustifolia*, une plante appartenant aux Oleacées, une des familles de plantes les plus abondantes en Algérie, endémique du bassin méditerranéen. En raison de ses applications préventives importantes en médecine traditionnelle et pour ses activités biologiques, tels que l'activité anti-inflammatoire (**Tsai, 2004**) et anti-oxidante (**Atmani et al., 2009, Ayouni et al., 2016**). Elles représentent couramment un sujet de recherche scientifique intéressant.

Afin de maitre en évidence d'autres éventuelles activités, tel que l'effet génotoxique et anti-génotoxique de différentes parties de cette plante, plusieurs tests sont établis tel que le test de *allium cepa* et le test de Ames.

Le but de cette présente étude est d'évaluer par le test des aberrations chromosomiques le potentiel génotoxique et anti-génotoxique de l'extrait par décoction des feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur la génotoxicité induite par un mutagène chimique qui est le cyclophosphamide *in vivo*.

I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- LA DIVISION CELLULAIRE

I.1.1- LES PHASES DU CYCLE DE DIVISION CELLULAIRE

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Le cycle cellulaire est classiquement divisé en: une phase (G1) où les cellules passent par un point de restriction, à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé, une phase (S) au cours de laquelle l'ADN est répliqué, une phase (G2) au cours de laquelle les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules-filles, grâce au fuseau de division et une phase (M), elle-même subdivisée en une suite d'étapes morphologiques et biochimiques différentes: Prophase, Métaphase, Anaphase et Télophase (**Beraud, 2001; Meijer, 2003**).

Les quatre phases s'enchaînent de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. En effet de nombreux mécanismes de contrôle assurent une sorte de « contrôle qualité » à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie (endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique) est détectée (**Pommier et al., 2003 ; Stewart et al., 2003**).

I.1.2- CONTROLE DE CYCLE CELLULAIRE

Lorsque l'ADN est endommagé, des mécanismes complexes sont activés. Ils conduisent à un arrêt du cycle cellulaire et permettent à la cellule soit de réparer cet ADN endommagé, soit, si les dommages sont trop importants, d'enclencher un programme de mort cellulaire (**Friedberg, 2003**). Les gènes impliqués se regroupent en gènes favorisant la prolifération cellulaire (oncogènes), et en ceux qui l'empêchent (suppresseurs de tumeurs) (**Meijer, 2003**).

Plusieurs niveaux d'arrêts sont possibles. On parle ainsi des « G1/S checkpoint » lorsque l'entrée en phase S est bloquée jusqu'à réparation de l'ADN endommagé (blocage de CDK2) et de « G2 DNA damage checkpoint », lorsque l'arrêt a lieu avant l'entrée en phase M (blocage de CDK1). Ils impliquent deux kinases appartenant à la famille des « phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases » (PIKKs) : ATM (« AtaxiaTelangiectasiaMutated ») et ATR (« ATM- and Rad3-related ») (**Shiloh, 2003**).

La kinase ATM agit par la voie p53-dépendante. Le suppresseur de tumeur p53 est activé sous l'effet de multiples facteurs (endommagement de l'ADN, choc thermique). Dans des

conditions normales la p53 se fixe au facteur MDM2, ce qui conduit à sa dégradation, dans des conditions contraires la kinase ATM est activée et phosphoryle MDM2, inhibant l'interaction MDM2/p53, ce qui libère et stabilise ainsi la p53. Par ailleurs, l'ATM phosphoryle la p53 (directement ou indirectement, par Chk2) (figure 01), renforçant sa stabilité. Une forte augmentation de l'activité de P53 aura comme conséquence l'arrêt de la prolifération cellulaire ou l'apoptose des cellules soumises à un stress (Chène, 2003).

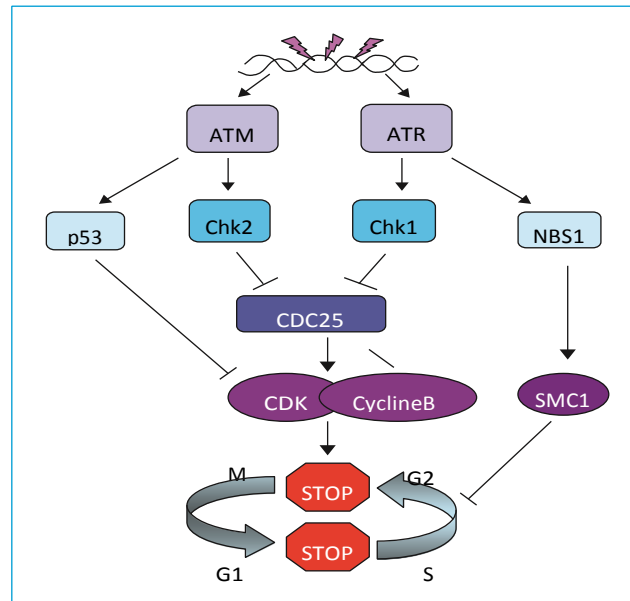


Figure (01) : Conséquences des dommages de l'ADN (Levy *et al.*, 2011)

I.1.3- LES INHIBITEURS PHARMACOLOGIQUES DU CYCLE CELLULAIRE

L'ADN contenu dans chaque cellule est constamment soumis à l'attaque d'agents qui peuvent lui porter préjudice. Les dommages de l'ADN provoquent le cancer, néanmoins ces mêmes dommages de l'ADN sont utilisés pour le guérir (Pourquier *et al.*, 2011).

La découverte des mécanismes régulant la division cellulaire a été suivie par la recherche de molécules aux propriétés anti-prolifératives. De nombreux composés anti-mitotiques se sont révélés utiles en chimiothérapie du cancer. Ainsi, on peut classer les produits anti-cancéreux classiques en quatre grandes catégories :

- **Les anti-métabolites**, qui se substituent en précurseurs de la synthèse d'acides nucléiques et bloquent la réplication de l'ADN tel que le 5-fluorouracil.
- **Les « poisons » du fuseau mitotique**, des molécules végétales qui perturbent la formation du fuseau mitotique impliqué dans le mouvement des chromosomes au cours de la mitose et bloquent ainsi la division cellulaire tel que la colchicine. Cette dernière est un alcaloïde souvent prescrit pour traiter l'arthrite goutteuse. Elle est alors donnée à petites doses pour

réduire le risque d'apparition de l'amylose (accumulation des sucres au niveau des articulations). Elle se fixe sur les molécules de tubulines, plus précisément sur la tubuline- α , ce qui inhibe la polymérisation du fuseau mitotique et bloque la mitose (**Ben-chetrit et al., 1989**).

- **Les agents alkylants**, qui altèrent l'ADN et bloquent ainsi la réplication, tels que les moutardes à l'azote (**Agner et al., 2005**).

La découverte des mécanismes régulant la division cellulaire se sont révélés utiles en chimiothérapie du cancer comme ces agents alkylants.

I.2- LES AGENTS ALKYLANTS

Il s'agit de la classe la plus ancienne des anticancéreux, ils agissent par interaction directe avec l'ADN. Ce sont des composés électrophiles qui réagissent avec des molécules possédant des substrats nucléophiles (phosphates, hydroxyles, carboxyles, amines, sulfures, etc.), que l'on retrouve dans les acides nucléiques et les protéines. On distingue des agents alkylants monofonctionnels, ce qui signifie qu'ils n'ont qu'un seul lien chimique avec l'ADN, et les agents alkylants bifonctionnels qui créent de véritables pont entre différents secteurs de l'ADN, de ce fait, l'alkylant relie deux nucléotides adjacentes pour former des ponts intra- ou inter-brins) (**Huang et al., 2009**).

La fixation de molécules à l'ADN et notamment la formation de "cross-links" Inter-brins empêche la réplication et la transcription (**Noll et al., 2006**), ce qui induit le plus souvent à des cassures simple- ou double-brins de l'ADN, conduisant ainsi à une apoptose de la cellule ou à la mise en exécution des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales (**phénomène de résistance**) (**Thurston, 2007**).

Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines n'en présentent que deux (N7 et N3). L'azote N7 de la guanine est la cible principale de l'alkylation, puisqu'elle a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN, puis les suivants ont des potentiels de moins en moins élevé : (O6-guanine et N3-adénine > N2-guanine, N-guanine et N7-adénine) (**Pullman, 1981**).

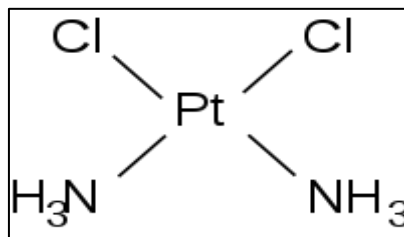
Les agents alkylants les plus utilisés sont les nitroso-urées, les sels de platine et les moutardes à l'azote.

I.2.1- LES NITROSO-UREES

Ce sont des composés alkylants bifonctionnels, qui se caractérisent par une réactivité chimique très importante, entraînant en milieu aqueux neutre une décomposition rapide en un groupe chloroéthyle à fonction alkylante et un isocyanate, agissant par carbamoylation des protéines. Les nitroso-urées sont des molécules liposolubles, ce qui favorise leur passage à travers la barrière-hémato-encéphalique, donnant accès au système nerveux central, tel est le cas de la carmustine (ou **Bicnu®**) qui est utilisée dans le traitement des tumeurs cérébrales malignes. Elle interagit principalement en N7 ou O6 des guanines (**Bodell, 2009**), et peut former ou non des "cross-links" interbrins.

I.2.2- LES SELS DE PLATINE

Les *cis*platines sont des dérivés platinés qui font partie des agents majeurs de la chimiothérapie d'un large spectre de tumeur solides (mélanome, glioblastom, cancer du foie...), il se fixent principalement au niveau de l'azote en position N7, c'est le cas de la *cis*platine ou (**Cysplatyl®**), qui interagit avec N7-guanine mais aussi avec d'autres sites du grand sillon de l'ADN comme O6-guanine et N7-adénine, constituant ainsi un pont intracaténaire (**Roberts et al., 1987**).



Figure(02): La structure de la *cis*platine

I.2.3- LES MOUTARDES A L'ZOTE

Le premier agent anticancéreux a été découvert au hasard, du fait des propriétés leucopéniantes d'un gaz de combat : le gaz moutarde qui fut employé la première fois par l'armée allemande en 1917, près d'ypres (Belgique).

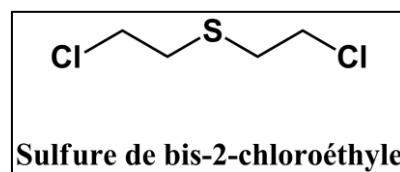


Figure (03): Structure du gaz moutarde ou ypérite

Le gaz moutarde ou l'ypérite, s'est avéré très toxique en raison de ses propriétés vésicantes et sa faible solubilité dans l'eau, ce qui justifie sa capacité à provoquer des lésions sur la peau aboutissant à la nécrose et de fortes difficultés respiratoires. Ainsi que d'autres effets inattendus du gaz moutarde : leucopénie (faible nombre de globules blancs), aplasie médullaire (fonctionnement défectueux de la moelle osseuse), tissus lymphoïdes dissous et ulcération gastro-intestinale. Ces lésions indiquent un effet important du gaz de combat sur toutes les cellules en division rapide (**Krumbhaar et al., 1919**). On cite parmi les moutardes azotées la méchloréthamine et le cyclophosphamide.

2.1.3.1- LA MECHLORETHAMINE

Cette substance dérive de l'idée de synthétiser une molécule moins toxique qui possède la même structure que l'ypérite, quoi que l'atome du soufre a été remplacée par celui de l'azote méthylé, cette molécule modifie la structure de l'ADN en empêchant ainsi la division cellulaire. Les moutardes à l'azote ont marqué les premières luttes de chimiothérapie anticancéreuse (**Gilman et al., 1946**).

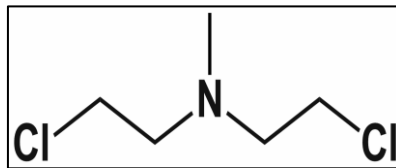


Figure (04): Structure de méchloréthamine

La méchloréthamine réagit principalement avec la position N7 des résidus guanines via un intermédiaire aziridinium pour former une guanine N7-alkylée. Ce mono-adduit va ensuite former un second intermédiaire aziridinium, qui pourra soit réagir avec l'eau ou avec un second résidu guanine pour former le "cross-link" entre deux brins de séquence 5'-GNC (**Millard et al., 1991 ; Jagetia et al., 2004**). Cependant, les guanines N7-alkylées sont peu stables, une rupture du pont N-glycosyl peut avoir lieu, ce qui crée un site abasique ou un dérivé formamido-pyrimidine (FAPY), plus stable (figure 05) (**Noll et al., 2006**).

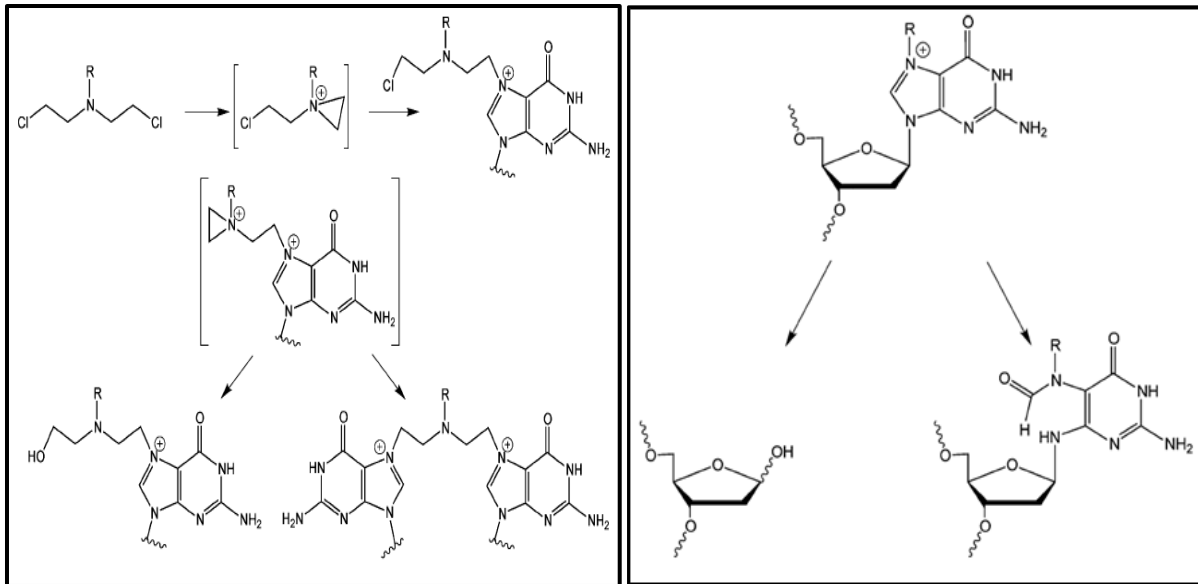


Figure (05): Réaction d'alkylation sur N7-guanine et formation des cross-links par les moutardes à l'azote (Noll *et al.*, 2006).

I.2.3.2- LE CYCLOPHOSPHAMIDE (CP)

Le cyclophosphamide (ou **Endoxan®**) (Figure 06) constitue l'exemple type des dérivés de moutardes azotées.

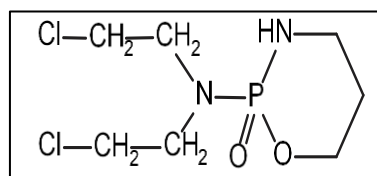


Figure (06): Structure de cyclophosphamide ou (N, N-bis(2-chloroéthyl) -1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxyde)

Le cyclophosphamide est un agent alkylant bifonctionnel appartenant au groupe des oxaphosphorines, c'est une molécule ancienne possédant de nombreuses indications et souvent utilisée en association en oncologie. C'est un antinéoplasique utilisé contre plusieurs types de cancer tel que : le carcinome du sein, du poumon, des ovaires, des testicules et de la vessie, les sarcomes des tissus mous et des os, le lymphome Hodgkinien et non-Hodgkinien, la leucémie lymphoïde chronique, le neuroblastome et la tumeur de Wilms et de myélomes multiples (Moore, 1991 ; Gilbert *et al.*, 1998 ; Chhipa *et al* 2006).

L'effet cytotoxique des oxazaphosphorines dépend de leur capacité d'alkylation de l'ADN. L'activation de CP dans le foie par la cytochrome oxydase P450 conduit à la formation de la moutarde azotée, le métabolite actif de CP. Cette dernière pénètre dans le noyau (via une diffusion passive et/ou via un transporteur), où elle se transforme en ion aziridine à pH alcalin ou neutre, puis réagit avec les bases puriques de l'ADN, notamment au niveau de l'azote N-7 de la guanine, en liant leur groupe actif (le chloroéthyl) à l'azote, ceci aboutit à la formation des ponts inter ou intra caténaux provoquant une toxicité tissulaire, voir la mort des cellules (Figure 07). D'autres bases d'ADN pourraient être les cibles d'action de la moutarde azotée comme l'azote N-1 et N-3 de l'adénine, l'azote N-3 de la cytosine, et l'oxygène O-6 de la guanine mais elles sont moins importantes.

Après la formation des ponts avec l'ADN, les cellules tumorales seront soumises à l'apoptose initiée par des lésions et l'inhibition de la réplication de l'ADN, la modulation du cycle cellulaire, et d'autres effets antiprolifératifs. L'apoptose est catalysée par une activation intracellulaire d'une cascade de caspases (**Zhang *et al.*, 2005**).

Le cyclophosphamide présente également un effet immunosuppresseur (**Huang *et al.*, 2013**), qui a été utilisé dans plusieurs expériences notamment l'évaluation de l'effet anti-immunosuppresseur de l'oignon lectine (*Allium cepa* agglutinine) car l'administration du CP a des rats Wistar combiné à cette plante provoque une production de molécules pro-inflammatoires COX2 et une élévation des molécules immuno-régulatrice (TNF- α) (**Kumar *et al.*, 2016**).

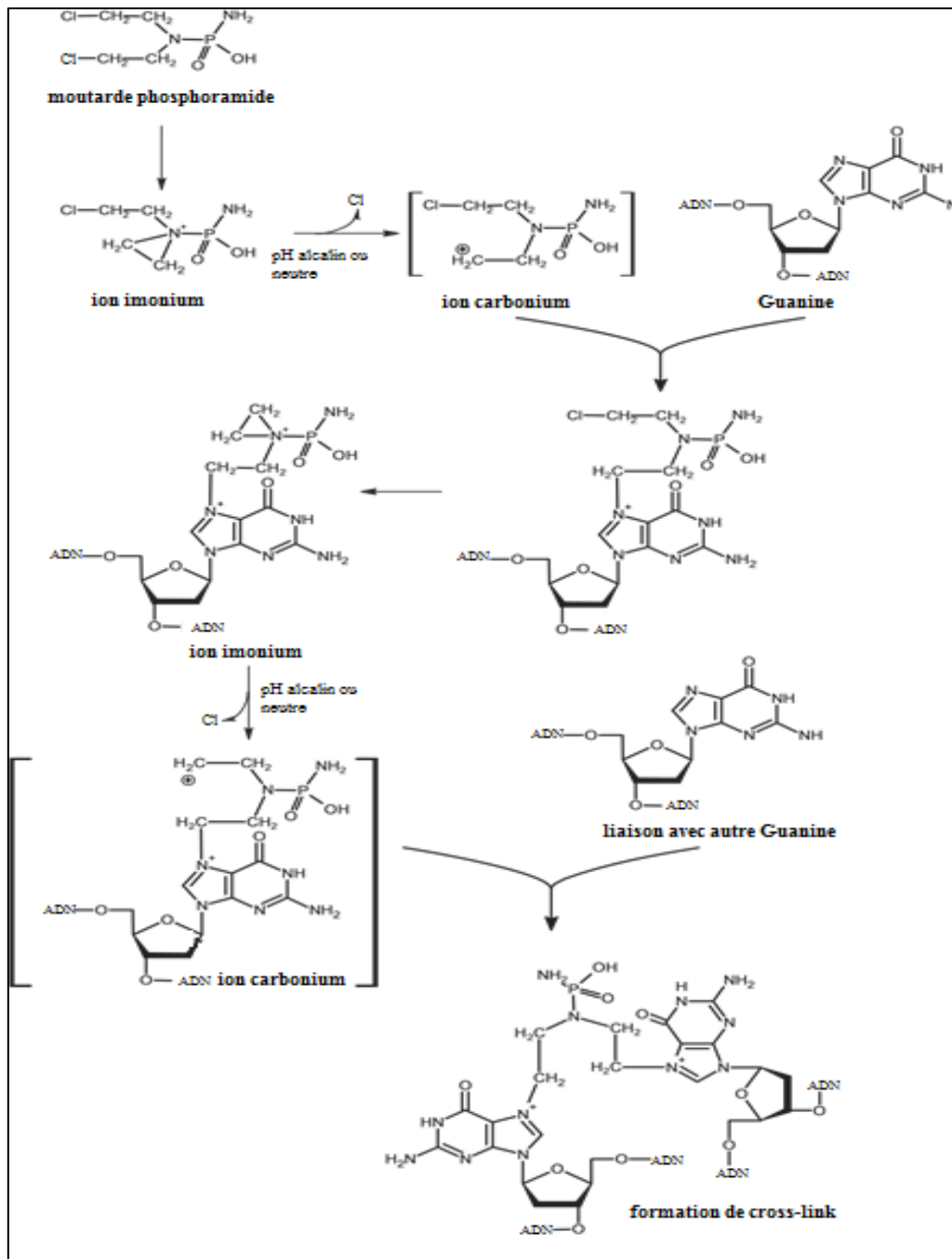


Figure (07):Le mécanisme d'action du cyclophosphamide au sein des cellules
(Zhang *et al.*, 2005).

I.2.3.2.1- LA PHARMACOCINETIQUE DU CYCLOPHOSPHAMIDE

La connaissance de la pharmacocinétique de cyclophosphamide à travers des études précliniques et cliniques est très utile afin d'améliorer son indice thérapeutique.

a)- ADMINISTRATION ET DISTRIBUTION DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Le cyclophosphamide est soluble dans l'eau ou l'alcool et peut être aisément administré par voie orale ou intraveineuse (i.v). La biodisponibilité orale de CP est de 85 à 100% (**Aeshlimann *et al.*, 1998**), avec une petite fraction du médicament qui est métabolisé en raison de l'effet du premier passage dans le foie et l'intestin. Le temps (Tmax) nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale (Cmax) est environ 1 à 2 heures, après l'administration orale de CP (**Goren, 1996**). Après administration par voie orale ou intraveineuse, le CP est rapidement distribué dans tout le corps par liaison aux protéines plasmatiques à un taux de 20%, alors que la capacité de liaison aux protéines est plus élevée pour son métabolite (<67%) (**Moore, 1991**).

Après l'administration i.v, le volume de distribution (Vd) se rapproche du volume d'eau corporelle totale, ce qui suggère que la distribution de l'agent a lieu avec une liaison tissulaire minimale. Le CP et son métabolite actif sont fortement liés aux érythrocytes qui peuvent servir de transporteurs du métabolite actif du CP. Le métabolite pro-toxique, le 4-hydroxy-PC, est piégé par voie intracellulaire et transporté vers les tissus tumoraux (**Zhang *et al.*, 2005**).

b)- METABOLISME DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Le CP est principalement métabolisé au niveau du foie à environ 70 à 80% (**De jonge *et al.*, 2005**) pouvant aller jusqu'à 90% de la dose administrée est activé par les enzymes hépatiques, notamment les cytochromes CYP3A4, CYP2C9 et la CYP2B6 qui jouent un rôle prédominant. Au moins deux voies de biotransformation sont impliquées, la voie principale consiste en une hydroxylation du cyclophosphamide en 4-hydroxycyclophosphamide, qui pénètre par diffusion passive dans le sang et est transporté vers des cellules tumorales par les globules rouges, un métabolite actif pouvant être oxydé en 4-cétocyclophosphamide ou 4-oxocyclophosphamide, un métabolite inactif, ou être en équilibre avec sa forme active acyclique (tautomère), l'aldophosphamide. Deux voies métaboliques sont alors possibles pour l'aldophosphamide, soit la production de la moutarde phosphoramidate, alkylant considéré généralement comme le principal responsable de l'effet anticancéreux (avec une β -élimination d'une molécule d'acroléine qui ne participe pas à l'effet thérapeutique, mais est la principale responsable des cystites hémorragiques), soit l'inactivation par formation, sous l'action de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), de carboxyphosphamide, non considérée comme toxique mais qui peut être transformée en une moutarde azotée. Il existe une voie métabolique mineure conduisant à la formation d'un métabolite inactif, le 2-déchloroéthylcyclophosphamide et d'un

métabolite actif, le chloroacétaldéhyde (Figure 08) (Boddy *et al.*, 2000; De Jonge *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005).

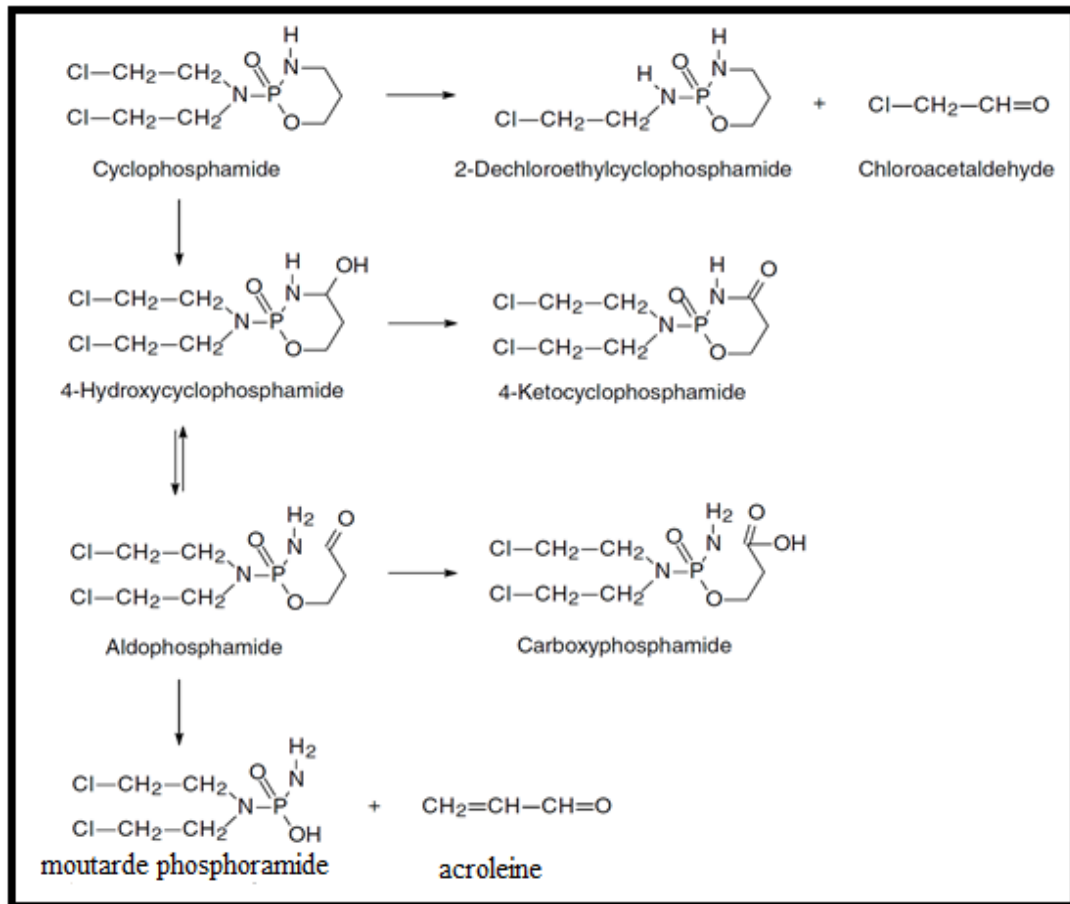


Figure (08): Schéma du métabolisme de cyclophosphamide (De Jonge *et al.*, 2005).

c)- ELIMINATION DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Le cyclophosphamide est principalement excrété par voie urinaire sous forme de métabolites. Seule une faible proportion de cyclophosphamide est éliminée dans les urines sous forme inchangée (5 à 20% de la dose administrée) et sa demi-vie d'élimination est soumise à de larges variations individuelles, elle est en moyenne de 5 heures avec une clairance corporelle totale (CL) d'environ 2,5-4,0 L / h / m² (Boddy *et al.*, 2000 ; Kerbusch *et al.*, 2001). L'élimination de la moutarde phosphoramide et de l'acroléine peut se réaliser par conjugaison spontanée ou par médiation de l'enzyme glutathion-S-transférase (GST) (De Jonge *et al.*, 2005).

d)- LA DOSE THERAPEUTIQUE ET EFFETS SECONDAIRES DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Lorsqu'il est utilisé seul en chimiothérapie du cancer, la dose est de 40-50mg/kg par voie intraveineuse ou 1-5 mg/kg par jour par voie orale. Par contre, lorsque il est utilisé en combinaison avec d'autres agents la posologie est inférieure (**Moore et al., 1994**). D'autres parts dans le traitement du syndrome néphrotique chez les enfants, la dose administrée de CP est à 2,5-3mg/kg par jour pendant 60-90 jours. Lorsque le CP est administré à des doses élevées, il peut causer la pancytopenie et la cystite hémorragique.

Afin d'éradiquer ou diminuer ces divers signes de toxicité, les chercheurs ont tenté de faire appel à la médecine par les plantes pour mettre au point un traitement anti-cancéreux aussi efficace et mieux toléré par l'organisme (moins d'effets secondaires).

I.3- PHYTOTHERAPIE ET PLANTES MEDICINALES

L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique utilisée depuis antiquité qui revient à 3000ans avant J.C. Tous les peuples ont élaboré des médecines selon leurs intelligences, leurs génies, leurs conceptions culturelles de la santé, de la maladie et les rapports qu'ils entretenaient avec leur environnement. De nombreuses plantes sauvages ont été préservées et utilisées à des fins médicinales. Plusieurs d'entre elles ont fait l'objet d'études sur différentes pathologies tel que l'hypertrophie, le cancer, le SIDA... et leur utilisation a été reprise en considération dans les années récentes (**Jensen et al., 2002**). La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique, à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes.

Les propriétés médicinales d'une plante peuvent résulter de la présence d'un grand nombre de produits phytochimiques actifs. Le mode de préparation d'un produit phytothérapeutique peut avoir un effet sur la quantité d'ingrédient actifs présents, le moment et la saison de la récolte de la plante, ainsi que le type du sol où elle pousse, peuvent également influencer son efficacité (**Mahdavi et al., 2008**). Les plantes médicinales étant entre-autre pharmacologiquement actives, elles peuvent être responsables d'effets nuisibles, dangereux voir mortels d'où la nécessité d'un système de phytovigilance.

I.3.1- FRAXINUS ANGUSTIFOLIA

Fraxinus, venu du mot grec "fraxis" signifie la clôture, un genre d'arbres de la famille des oléacées est ce compose de plus de 43 espèces dénombrées dans le monde incluant *F. angustilolia*. Elle se distribue dans les régions tempérées, les régions méditerranéennes dans

le sud de l'Europe, l'ouest de l'Asie (jusqu'à l'ouest de l'Iran) et dans le nord de l'Afrique (nord de l'Algérie et du Maroc) (**Wallander et al., 2008 ; Dobrowolska et al., 2011**).

Fraxinus angustifolia est un arbre majestueux pouvant atteindre de 15 à 35m de hauteur a rameaux verts, ponctués de blanc (**Wallander, 2008**), son écorce est de couleur grise, les bourgeons sont de couleur marron, les feuilles peuvent être regrouper sous forme d'une seule feuille et elles prennent une longueur entre 15 à 25 cm, ses fruits typiques sont les samares (**Yildiz et al., 2009**).

Connu sous le nom scientifique par *Fraxinus angustifolia*, de nombreuses appellations sont attribuées à cette espèce, elle est reconnue par un nom commun frêne oxyphyle en français, en anglais « narrowleavedAsh » (**Wallander, 2008**), « Dardar, Sella, Rasleut, Mesharouane, Lessane el asfour » en arabe et « Aslén, Asseln, islen, Tasseléne, taslent, Tabouchicht » sont les noms berbères (**Moulaoui, 2015**).

La systématique de cette espèce est décrite comme Suit :

Règne : végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Oléacées

Genre : Fraxinus

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

I.3.1.1- VERTUS ET UTILISATION EN MEDECINE

Les espèces de Fraxinus ont une importance économique, commerciale et médicinale (**Wallander et al., 2000**). En effet, les feuilles sont une grande ressource de fourrage (**Chevalier, 1927**). Le bois est employé pour la construction et constitue une source principale de carburant (**Gifa, 2012**). En particulier, différentes parties ont été employées pour traiter beaucoup de maladies inflammatoires comme le rhumatisme, l'arthrite et la goutte (**Beloued, 1998**). Il a été rapporté que les feuilles et les samares sont employées en décoctions et infusions contre le rhumatisme et la fièvre (**Baba-Aissa, 1999**). Les feuilles sont également efficaces contre la diarrhée et les parasites intestinaux, l'écorce est utilisée contre les calculs biliaires (**Gifa, 2012**), les hémorragies passives, et particulièrement contre des fièvres

intermittentes (Beloued, 1998 ; Djerroumi *et al.*, 2004). Cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle dans différents pays du monde avec diverses préparations, en tant que tisane, par décoction ou infusion (Çalis *et al.*, 1995).

I.3.1.2- LES COMPOSANTES PHYTOCHIMIQUES

La présence de coumarines, sécoiridoïdes et phenylethanoids est une caractéristique des espèces du genre *Fraxinus*. Les lignanes, les flavonoïdes et des acides phénoliques simples sont si communs, mais ils semblent avoir une distribution plus limitée.

I.3.1.2.1- LES COUMARINES

Ce sont des dérivés phénoliques à noyau benzopyrones (1,2-benzopyrones ou 2H-1-benzopyran-2-ones), qui se forme par une substitution sur un cycle aromatique, analogue à celle des dérivés de l'acide cinnamique. Lors de la biosynthèse de la coumarine, l'acide *trans*-cinnamique est transformé en acide-*o*-coumarique, qui est estérifié en β -glucoside. La transformation de ce composé *trans* en composé *cis* plus précisément le β -glucose de l'acide *o*-coumarique. Cette forme se change en coumarine en passant par l'acide libre *cis*-coumarique en acide 2-hydroxy-*cis*-cinnamique, presque toutes les coumarines sont substituées on position C7 par hydroxyl (Richter, 1993). Les coumarines sont retrouvées sous une forme libre ou sous forme de glucoside chez toutes les espèces de *Fraxinus* (figure 09) (Kostova et Isofova, 2007).

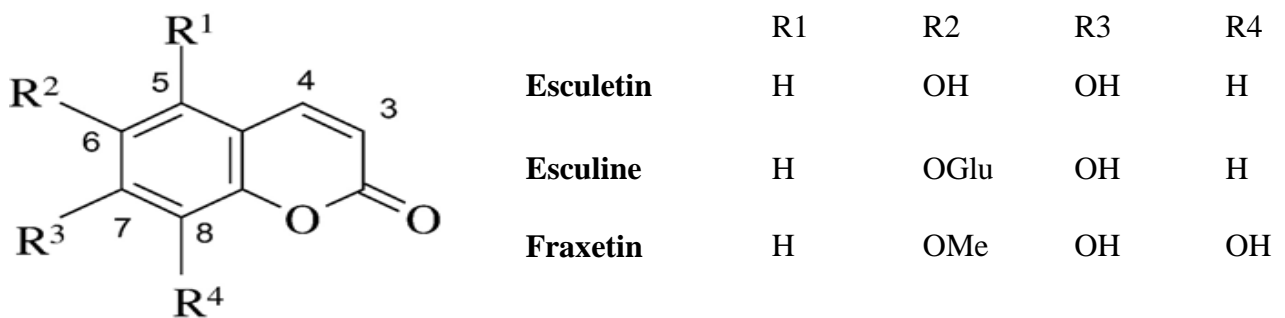


Figure (09): Structure de la coumarine (Kostova et Isofova, 2007)

I.3.1.2.2- LES SECOIRIDOIDES

C'est une classe de métabolites secondaires trouvés dans une grande variété de plantes, les monoterpènes, les plus répandus chez *Fraxinus angustifolia* sont : le ligstroside et l'oleuropein, fraxicarboside A [6''-hydroxyoleuropein O-*trans*-p-coumaroyl-10], Fraxicarboside B [6''-O-*trans*-caffeoyl-10-hydroxyoleuropein], fraxicarboside C [acétyle

de 3'' O 6 ''- O-trans-caffeoyl-10 - hydroxyoleuropein], 10-hydroxyoleuropein, 10 hydroxyligstroside (**Hosny, 1998**); et ligstral,angustifolioside A [6''-O- (β-D-glucopyranosyl)-oleuropein] et angustifolioside B [6''-O-(β-D-glucopyranosyl)-ligstroside] (**Çalis et al., 1993**), et angustiflioside C [6'-O- (β-D-glupyransyl) -neoleuropein] sont isolés par extraction méthanolique des feuilles *Fraxinus angustifolia* (figure 10) (**Çalis et al., 1996**).

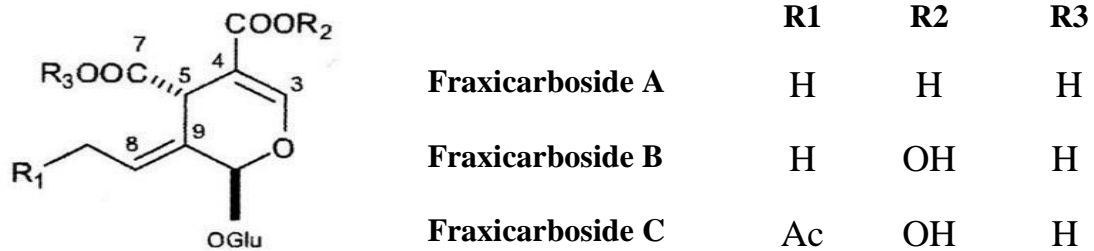


Figure (10): La structure chimique de quelques secoiridoides (**Çalis et al., 1996**).

I.3.1.2.3- LES LIGNANES ET LIGNINES

Les lignines sont des substances non glucosidiques qui se déposent dans certaines cellules végétales (**Potier, 2000**). Du point de vue chimique les lignines sont des mélanges de polymères amorphes de trois constituants fondamentaux, les alcools hydroxycinnamiques (*p*-comarylique) coniferylique et sinapylique, à ces phénylpropanes secondaires s'ajoute de petites quantités d'acide cinnamique et d'aldéhyde cinnamique (**Gerhard, 1988**).

Les lignanes répondent à une présentation structurale de type (C₆C₃)₂. Les plantes les élaborent par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique, lorsqu'il y'a uneliason directe C-C entre les unités C₆C₃ mais liés par un atome d'oxygène d'éther, le composé est appelé oxynéolignane tels que les sésquinéolignanes (3unités de C₆C₃) et les dinéolignanes (quatre unités de C₆-C₃) (figure 11) (**Sakagami et al., 2005**).

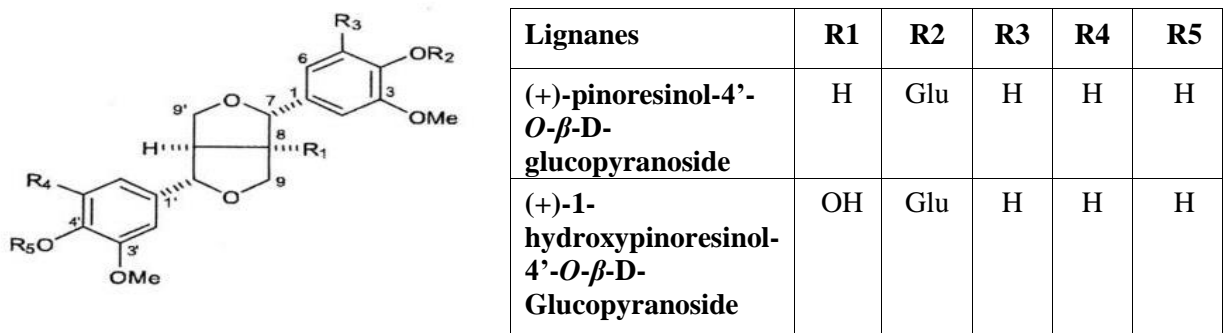
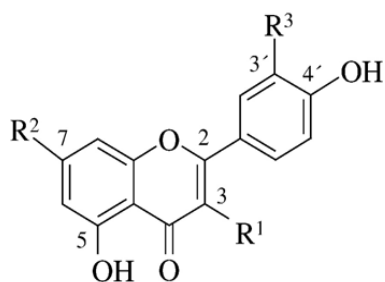


Figure (11): Structure chimique des lignanes de *Fraxinus angustifolia* (**Hosny, 1998**)

I.3.1.2.4- LES FLAVONOÏDES

Ils proviennent de l'addition de trois groupements en C2 au *p*-hydroxycinnamate ou au caféate avec formation de deux noyaux benzéniques que réunit une chaîne de trois atomes de carbone et on distingue un grand nombre de flavonoïdes, selon le degré d'oxydation de cette chaîne (figure 12) (Potier, 2000).



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

Figure (12): Structure chimique des flavonoïdes (Bruneton, 1999; Kostova et Iossifova, 2007)

En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes: anthocyanidines; flavonoles; isoflavonoles; flavones; isoflavones; flavanes; isoflavanes; flavanols; isoflavanols; flavanones; isoflavanones et auronones (Kostova et Iossifova, 2007)

Ces métabolites sont impliquées dans plusieurs activités biologiques intéressantes de *F. angustifolia*, néanmoins la toxicité des composés phénoliques est assez documenté (Kostova et al., 2006), cette toxicité peut atteindre l'intégrité du matériel génétique. En effet, La génotoxicité se définit comme la capacité de certains agents dits « génotoxiques » à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations géniques ou chromosomiques.

Les tests de génotoxicité visent à mettre en évidence l'altération par des composés chimiques ou physiques du matériel génétique, pouvant conduire, si les lésions génotoxiques ne sont pas efficacement et correctement réparées par les systèmes enzymatiques adéquats, à des mutations. (Hartmann et al., 2004).

Pour ce d'avantages évaluation de la génotoxicité (Ames et al., 1973) sont adaptés de plus en plus à l'évaluation de la génotoxicité des extraits de plantes médicinales (Gupta et al., 2015). On distingue plusieurs tests selon l'objectif de l'étude tels que le test de Ames; le test des comètes ; des micronoyaux ; et le test des aberrations chromosomiques.

- TEST DE AMES

Il consiste à évaluer si une substance chimique ou agent physique est capable d'induire des mutations chez différentes souche de *Salmonella typhimurium*. Ces souche sont porteuse d'une mutation préalablement induite dans un des gènes de la chaîne de biosynthèse de l'acide aminé histidine elles sont dites auxotrophe à l'His. Le test évalue la réversion de l'auxotrophie de la souche vis à vis de l'His. 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, 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.

-TEST DES COMETES

Est une méthode simple, économique permet de mesuré les cassures simples et doubles brins d'ADN dans la cellule (**Dhawan et al., 2009**). Le principe consiste à récupérer l'ADN dans un gel après destruction des membrane protectrice de la cellule. La suspension est ensuite soumise à un champ électrique, dans une cuve d'électrophores.il s'agit d'une technique qui permet de séparer les molécules en fonction de la charge électrique et de la taille. L'ADN endommagé charge négativement va migrer vers le pole 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 (**Carla et al., 2006; Collin, 2004**).

-TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

L'essai d'aberration chromosomique est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations structurales dans des cellules eucaryotes tels que celles de la moelle osseuse, généralement des rongeurs (rats, souris et hamsters) (**Cimino, 2006**). Plusieurs types d'anomalies chromosomiques peuvent être détectés, notamment les anomalies de nombre (aneuploïdie, hyperploïdie, hypoploïdie et polyploidies) ou les anomalies de structure (délétion, translocation, inversion...).

Des animaux sont exposés à la substance d'essai (liquide ou solide) par une voie d'exposition appropriée (gavage, injection intrapéritonéale, ...) et sont sacrifiés après les traitements. Avant le sacrifice, les animaux sont traités par la colchicine un inhibiteur de fuseau mitotique

(Sram *et al.*, 2007). Des préparations chromosomiques sont alors faites à partir des cellules de moelle osseuse colorées, et les cellules en métaphase sont analysées et examinées au microscope optique (au moins 100 par conditions) pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques (Preston *et al.*, 1987).

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

Cette étude vise à étudier l'activité génotoxique ou anti-génotoxique de l'extrait aqueux des feuilles de *Fraxinus angustifolia* contre l'effet du mutagène chimique le cyclophosphamide en utilisant le test des aberrations chromosomiques sur des souris.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1- MATERIEL VEGETAL

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de *Fraxinus angustifolia* (Figure 13) qui ont été récoltées dans la forêt de Chemini (963m altitude 36°35' latitude, 4°36 longitude) en mois de juillet 2015. Cette localité est située à 70km de la ville de Béjaia. Le climat dans cette localité est méditerranéen de type Csa avec un étage climatique sub-humide selon le diagramme oubbrothermique d'Embeyer. Les échantillons ont été identifiés par comparaison aux échantillons référenciés de l'Herbier de l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques (ENSA), El-Harrach, Alger.



(A)



(B)

Figure (13): Photographies originales de l'arbre (A) et des feuilles (B) de *Fraxinus angustifolia*.

II.1.2- LES ANIMAUX DE LABORATOIRE

L'évaluation de l'activité génotoxique *in vivo* des extrait de feuilles de *F. angustifolia* a été conduite sur des souris albinos mâles et femelles de type NMRI, (procurées de Noval Medical

Research Institute, l'institut Pasteur d'Alger), les animaux âgées de 6 à 8 semaines et ayant atteint un poids de 27-35g ont été utilisés. Les expériences ont été réalisées dans le laboratoire d'expérimentation animale de l'université de Bejaia. Les souris ont été gardées dans des conditions contrôlées de température ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) et des périodes de lumière/obscurité de 12/12h. L'alimentation a consisté en un régime à base de nourriture pour bétail (ONAB, El Kseur, Béjaia) et de l'eau potable.



Figure (14): Photographie originale des souris utilisées en expérimentation.

II.2- METHODES

II.2.1- PREPARATION DE LA DECOCTION DE FEUILLES DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*

Les feuilles récoltées ont été soumises à un séchage à l'air libre à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique en poudre fine ayant une granulométrie de $63\mu\text{m}$.

L'extrait aqueux par décoction a été obtenu à partir de 150g de la poudre du matériel végétal qui ont été ajoutés à petites quantités à 1500ml d'eau distillée, sous une agitation continue à une température de 100°C pendant 1h. Ensuite le mélange a été laissé décanter durant 30min, puis le surnageant a été récupéré. Afin de garantir la plus grande extraction possible des principes actifs du tissu végétal, l'extraction a été répétée dans un volume de 750mL et chauffé à 100°C pendant 15 min. les surnageants obtenus ont été mélangés, homogénéisés et centrifugés à une vitesse de 5000

tours/min pendant 15min. Les surnageant récupérés ont été filtré à travers la laine de verre. Les décoctés obtenus ont été congelé a -80°C pendant 24h, pour être lyophilisé et stockés dans des flacons à fermetures étanche à une température de 4°C, jusqu'au moment de leur utilisation.

II.2.2- EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE L'EXTRAIT DES FEUILLES *F. ANGUSTIFOLIA* ET LE CYCLOPHOSPHAMIDE

II.2.2.1- LE TRAITEMENT DES ANIMAUX

Des souris NMRI mâles et femelles ont été séparés et pesées afin de déterminer la quantité d'extrait à leurs administrer, puis marquées et répartie en 14 lots de 6 souris chacun.

Après 1h30 de jeun, les groupes ont reçu en une seule prise des solutions d'extrait de *F. angustifolia* à différentes doses (125, 250, 500 et 1000 mg/kg) dans du CMC (0.8%). L'administration a été réalisée par voie intra-gastrique quotidiennement pendant 7jours consécutifs. Les groupes de souris ont été répartis comme suit :

Groupe I (CMC 0.8% + CP : 50mg/kg) : Ce groupe a servi de témoin positif, chez qui la génotoxicité a été induite par le cyclophosphamide. Les souris ont reçu par gavage du CMC (0.8%) (véhicule) pendant sept jours; le CP (50mg) a été administré par voie intra-péritonéale (i.p) après 2h du gavage.

Groupe II (CMC 0.8%) : Ces animaux ont servi de témoins négatifs ils reçoivent quotidiennement une solution véhicule (CMC 0.8%).

Groupe III .IV.V.VI : Ce sont des groupes utilisés pour le test de génotoxicité. Les souris n'ont reçus que l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* à différentes doses : 125, 250, 500 et 1000 mg/kg, respectivement.

Groupe VII : Ce groupe employé pour le test anti-génotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles *F. angustifolia*, contre les dommages induits par le cyclophosphamide. Les souris ont reçu, par gavage, l'extrait de *F. angustifolia* à une dose de 250mg/kg. Pendant sept jours. Au bout du dernier jour, les souris ont reçu le CP (50mg/kg) par injection intrapéritonéale.

L'eau a été remise aux animaux juste après traitement et la nourriture une heure plus tard.

Les animaux ont été mis d'abord en observation pendant les premières heures après les traitements.

Ensuite chaque 24h tout au long du traitement, ceci vis-à-vis leurs comportement générale.

Les poids des souris ont été vérifiés le 4^{ème} et le 7^{ème} jour du traitement, notamment pour être précis concernant la dose de la colchicine (4 mg/kg) à injecter deux heures avant le sacrifice des souris (**Preston *et al.*, 1987**).

II.2.2.2- SACRIFICE DES SOURIS, PRELEVEMENT DES FEMURS ET EXTRACTION DE LA MOELLE OSSEUSE

Le test des aberrations chromosomiques a été effectué selon le protocole rapporté par Preston *et al.* en 1987. Au 8^{ème} jours après le gavage, les souris ont été traitées par la colchicine (i.p) (24h après le CP) et 2h avant le sacrifice par dislocation cervicale. Le fémur a été excisé et la moelle osseuse a été aspirée par rinçage avec 8ml de solution hypotonique (KCl à 0.56%), préincubé au bain marie à 37°C; pendant 30min afin de provoquer une pression osmotique des noyaux. puis centrifugées à 1500 tours/min durant 10 min. Les cellules ont été resuspendu dans un volume de KCl puis ont été fixées par la suite dans 5ml de fixateur de Cornoy (méthanol: acide acétique= 3v: 1v) ajouté délicatement goutte à goutte, puis 2ml de fixateur ont été ajoutées et les suspensions ont été incubées a 4°C. Deux autres centrifugations ont été répétées le lendemain. Et le dernier culot obtenu a été resuspendu dans un même volume minimal du fixateur pour obtenir une suspension laiteuse homogène (figure 15).

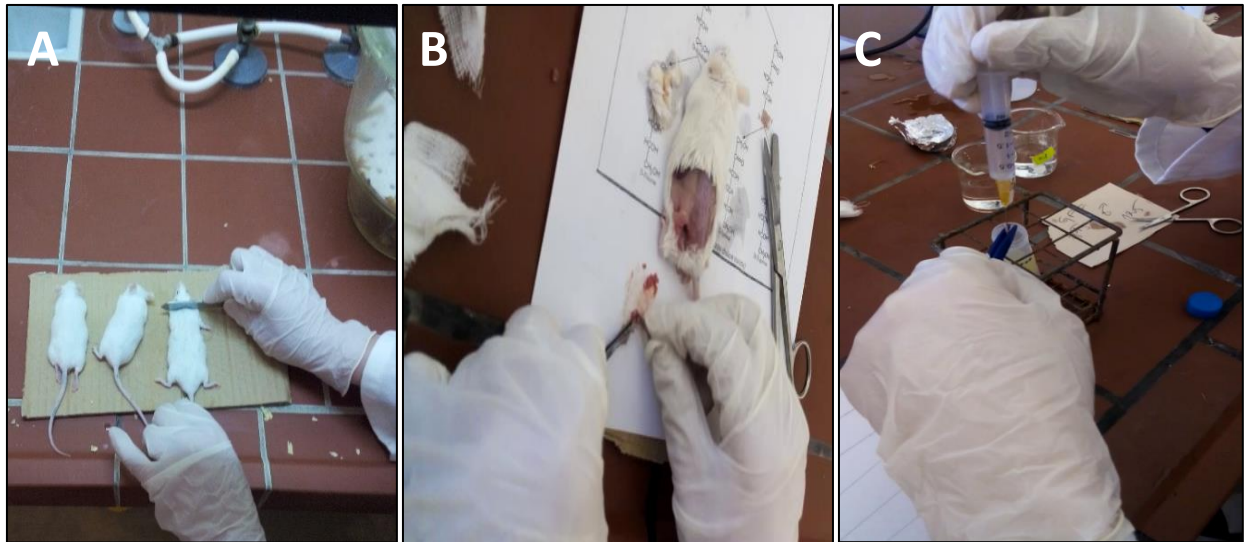


Figure (15): Sacrifice des souris (A), prélèvement des fémurs (B) et extraction de la moelle osseuse (C).

II.2.2.3- FIXATION SUR LES LAMES, COLORATION ET OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Les suspensions récupérées ont été déposées sur des lames soigneusement nettoyées et étiquetées, et laissées sécher pendant 2h. Les lames ont été colorées avec une solution Giemsa (10%) pendant 20 min puis rincées avec de l'eau distillée deux fois.

Pour conserver les échantillons fixés et colorés, l'euro-kit est soigneusement étalé dans des lamelles qui sont mises pendant quelques minutes dans du xylène, puis coller la lame et la lamelle à l'aide d'une pince pour bien fixer et éviter la formation des bulles d'air. Les lames ont été laissées séchées durant 24h et l'excès de colle a été enlevé par un bistouri. Les lames sont ainsi prêtes pour la lecture au microscope optique (figure 16).

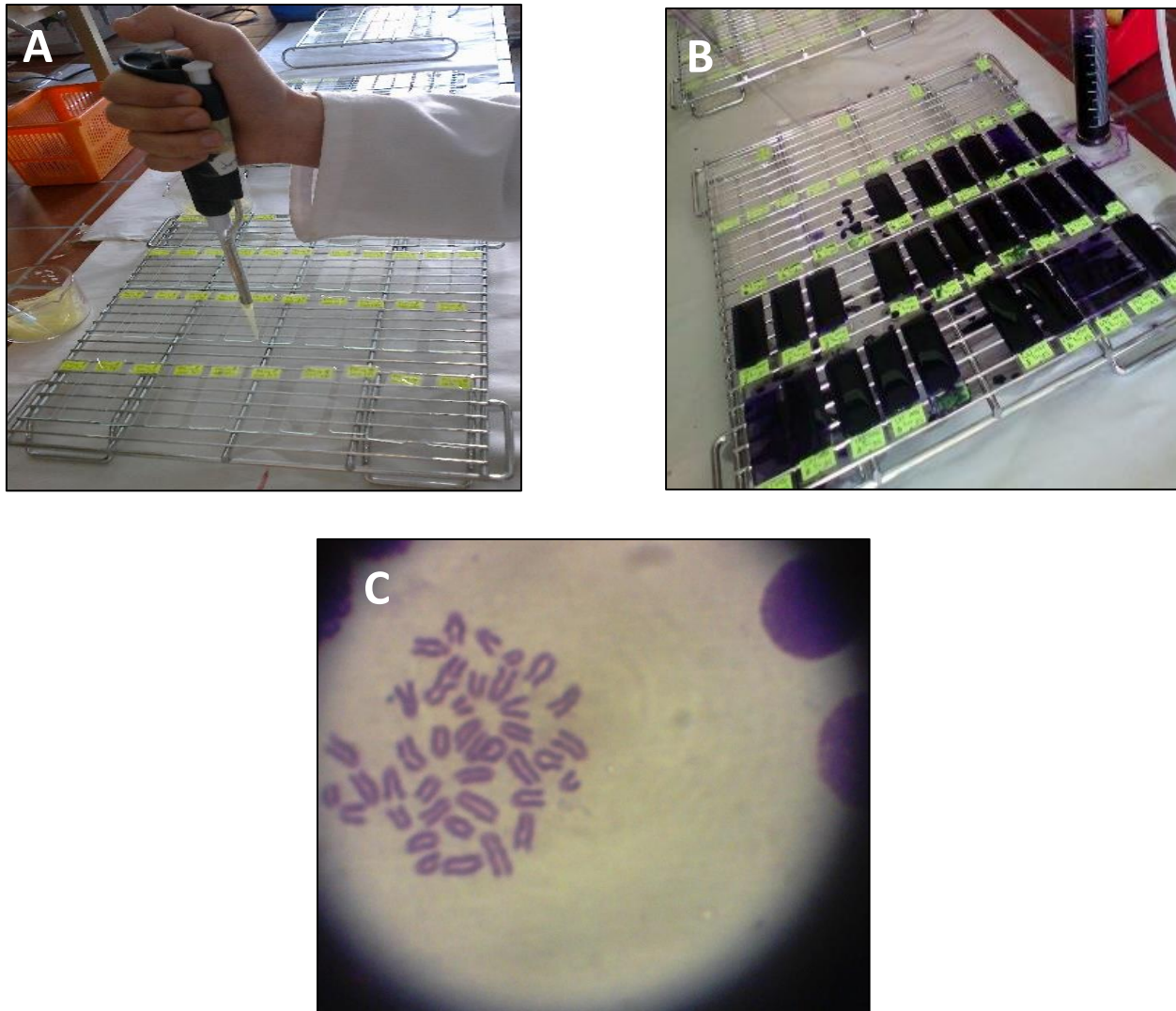


Figure (16): Fixation sur lames (A), coloration (B) et observation microscopique (C)

II.2.2.4- ANALYSE MICROSCOPIQUE ET DENOMBREMENT DES ABERRATIONS

L'analyse microscopique consiste à dénombrer les cellules en interphase, prophase et métaphase (bonne distinction entre une métaphase spread et une pro-métaphase). Le nombre total moyen des cellules analysées par souris était 100 métaphases. En utilisant un microscope optique avec un objectif X40. En prenant en considération les différents stades de division cellulaire pour calculer l'indice mitotique (IM) de chaque souris examiné, par la formule suivante selon (**Mazumdar *et al.*, 2011**).

$$\text{IM}(\%) = \frac{\text{Nombres de cellules en division}}{\text{Total des cellules dénombrées}} \times 100$$

Dans cette analyse, les aberrations chromosomiques à savoir : (Gap, Fragment, Ring, Association centromérique, polyploïdes et pulvérisation), en utilisant de l'huile à émersion avec un objectif X100.

La moyenne des cellules dans chaque phase du cycle de division et le taux des cellules aberrantes est calculé par la formule suivante selon (**Mazumdar *et al.*, 2011**).

$$\text{TAUX DES ABERRATIONS} = \frac{\text{Nombre de cellules aberrantes}}{\text{Total des cellules dénombrées}} \times 100$$

II.2.2.5- ANALYSE STATISTIQUE

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

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- RESULTATS DE L'EXTRACTION

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en été 2015, une période durant laquelle cette partie de plante a atteint le stade de maturité. Le but de cette extraction par décoction est de respecter la méthode de préparation traditionnelle des feuilles de *F. angustifolia* dans le traitement des différentes pathologies. Cette extraction vise aussi à obtenir dans cette phase aqueuse un maximum de substances polaires et moyennement polaires, particulièrement les composés phénoliques. Le rendement obtenu de cette extraction est d'environ 16%, un taux considéré relativement élevé.

III.2- INDUCTION DE LA GENOTOXICITE PAR LE CYCLOPHOSPHAMIDE

Les résultats de l'analyse statistique des indices mitotiques et le pourcentage des cellules aberrantes de la moelle osseuse des lots contrôles positif et négatif, traités par le CP (50 mg/kg) et le véhicule (CMC 0.8%), respectivement, sont représentés dans l'histogramme suivant :

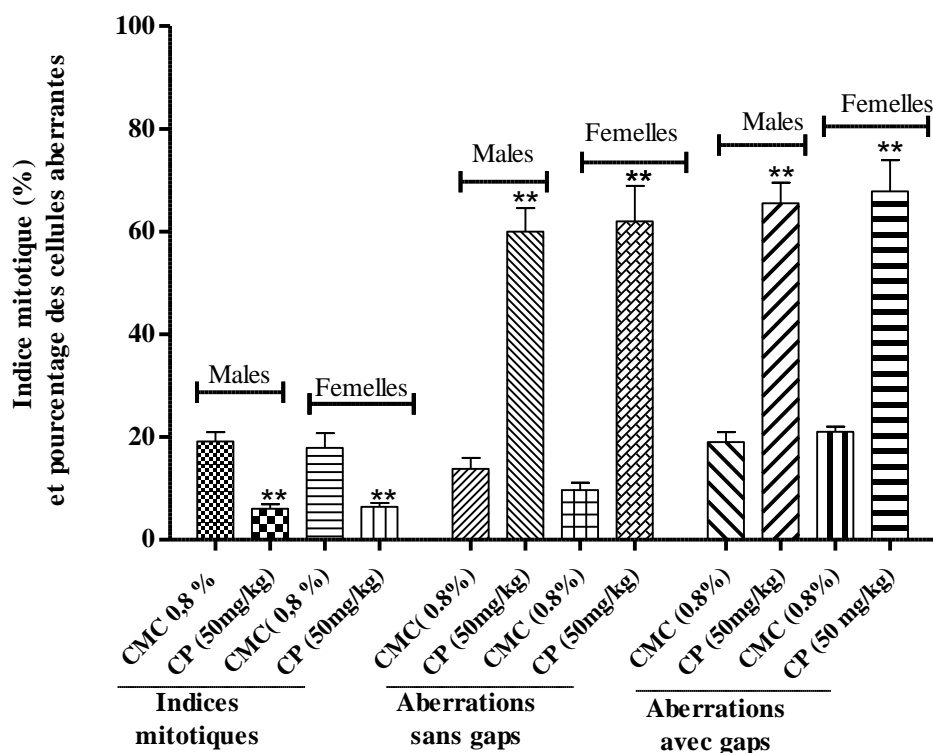


Figure (17): Indices mitotiques et pourcentage des cellules aberrantes chez les lots contrôles négatif CMC (0.8%) et positif CP (50mg/kg). **P<0.01% comparativement au lot contrôle négatif.

L'analyse statistique comparative des indices mitotiques des lots contrôle négatif et contrôle positif, aussi bien chez les mâles que chez les femelles, a montré une différence significative (*P<0.05), ce qui indique que le CP a exercé un effet cytotoxique comparativement au CMC. D'autres parts, la comparaison des pourcentages des cellules aberrantes (avec et sans gaps) ont montré une différence très hautement significative (**P<0.001) entre les contrôles positif et négatif, ce qui explique la forte diminution de l'indice mitotique des lots traités par le CP. Le taux des aberrations chez les souris contrôle négatif CMC (0.8%) est très réduit, ce qui indique l'occurrence d'un petit nombre de cellules aberrantes spontanément.

L'IM diminué associé à l'augmentation de pourcentage des aberrations chromosomiques signifie que le CP est responsable des taux des aberrations induites dans les cellules de la moelle osseuse des souris, ayant subi ce traitement. Ces résultats suggèrent que l'augmentation des aberrations induites par le xénobiotique CP provoque une perturbation et/ou un blocage de la division cellulaire qui induirait la mort cellulaire.

Les types et la fréquence des aberrations détectées par l'analyse microscopique des métaphases ont été dénombrés et rapportées dans le tableau I.

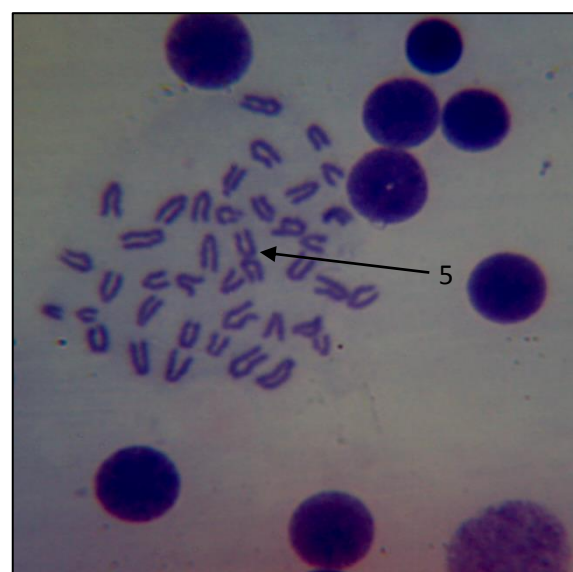
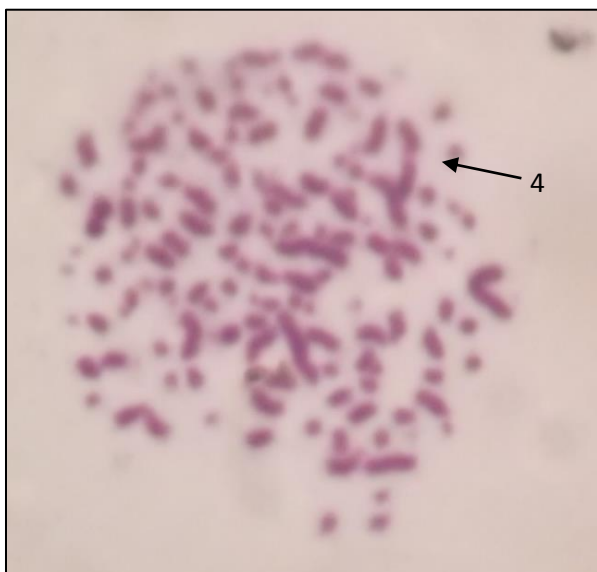
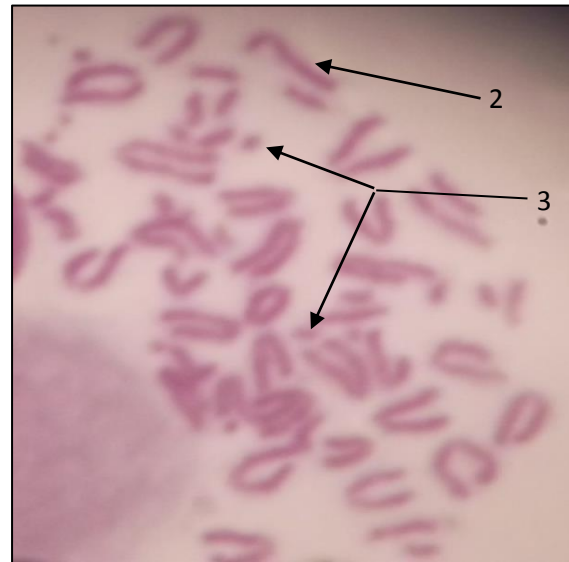
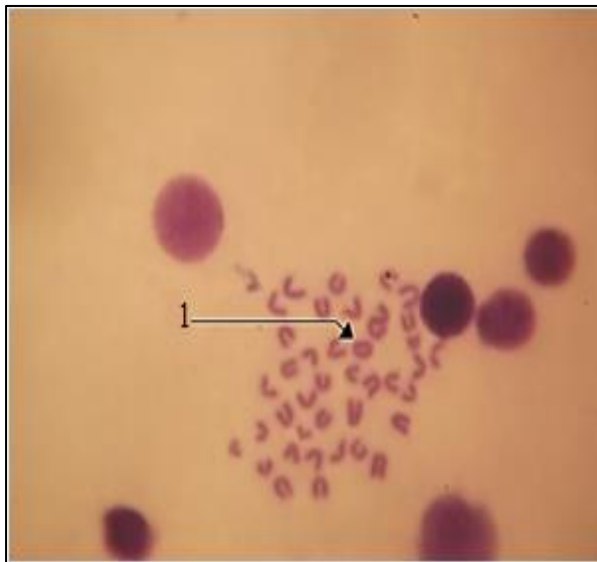
Tableau I: Aberrations chromosomiques détectées chez les lots contrôles négatif et positif.

Doses (mg/kg)	Met.spread Number	Différentes aberrations chromosomiques							
		Vide Gap	anneau (Ring)	Fragment	Del.chrom	Ass .cent	Pulvérisation	Polyplöid	
C- (0.8%)	♀	50	5	1	1	1	2	0	1
		50	9	1	3	1	0	0	0
		100	12	3	1	1	2	0	0
		100	7	3	11	7	0	0	0
	♂	100	8	5	12	10	4	0	0
		100	10	4	10	8	2	0	0
		50	15	1	2	1	1	0	1
C+ (50mg/kg)		50	5	1	1	1	2	0	1
		100	4	2	10	1	3	0	0
	♀	100	18	0	36	29	6	1	0
		80	4	7	23	14	2	37	0
		100	6	5	17	10	2	78	0
		100	7	9	46	27	6	5	0
		100	27	20	24	27	10	8	2
	♂	100	6	3	16	3	9	5	0
	100	9	12	32	9	10	22	0	
	84	5	2	20	0	1	6	2	

Le tableau précédent permet d'examiner la différence de l'incidence des types d'aberrations et d'analyser leur fréquence entre les deux lots. Le CP a induit une augmentation marquée des différents types d'aberrations, à savoir des gaps, des anneaux, des délétions chromosomiques, des associations centromériques, des polyploïdies et surtout une forte expression de pulvérisations et de fragmentations, comparativement au contrôle négatif, qui n'a présenté que quelques fragmentations et aucune pulvérisation. Les mêmes constatations ont été retenues pour les mâles et les femelles. Ceci appuie la diminution de l'indice mitotique et suggèrerait que ces aberrations sont fortement impliquées. Certaines photographies de ces aberrations sont illustrées ci-dessous :

1 : Ring (anneau), 2 : Délétion chromosomique , 3 : Fragments, 4 : Pulvérisation,

5 : Association chromosomique, 6 : Gap (vide), 7 : Polyploidie



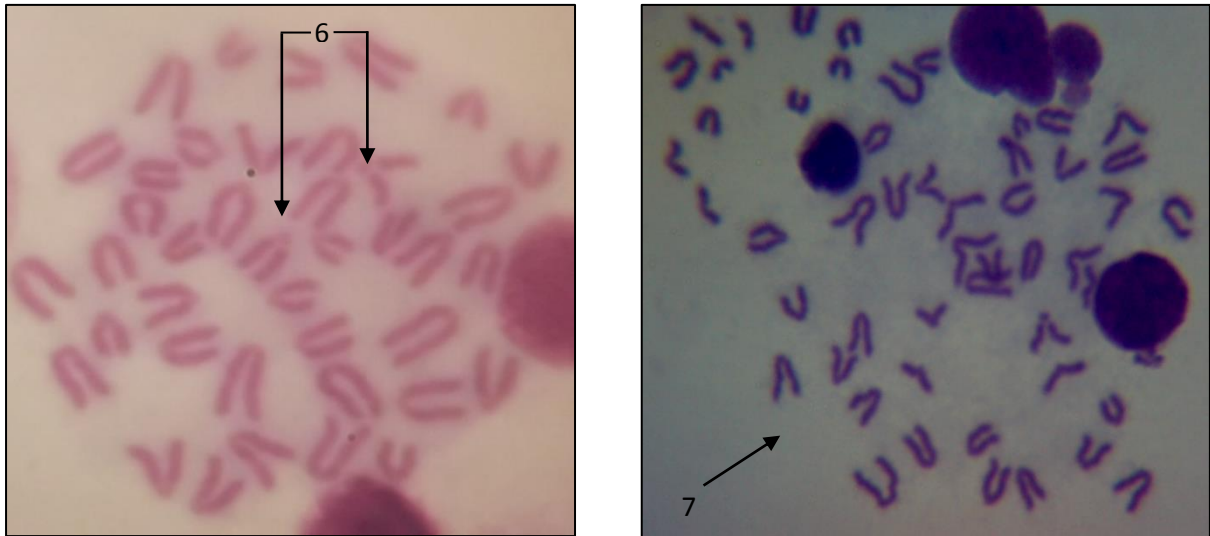
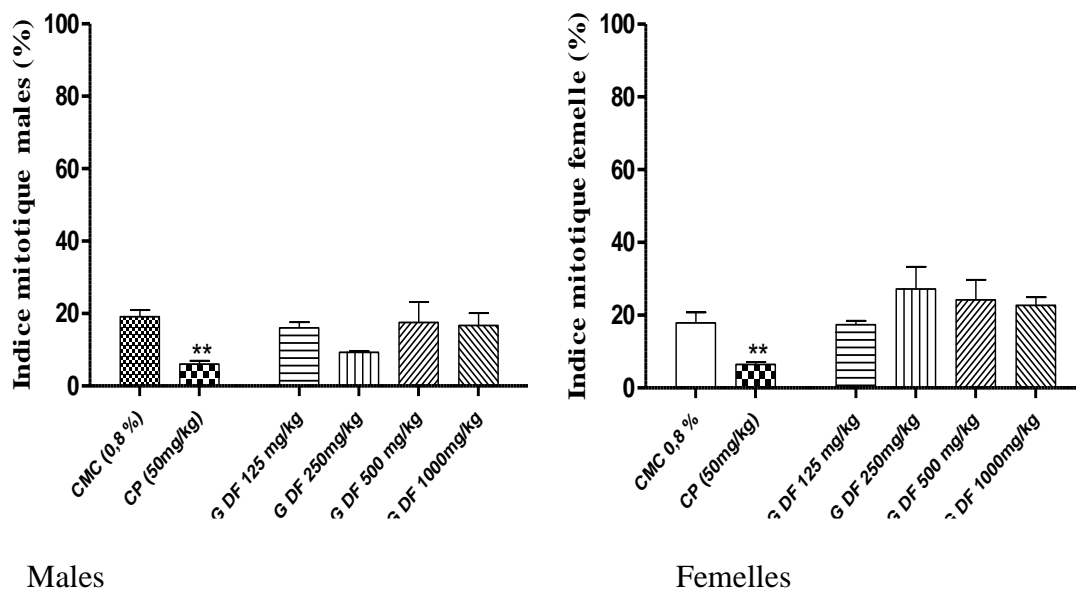


Figure (18): Photographies originales des aberrations détectées chez les lots contrôles négatif et positif (grossissement x100)

III.3- EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE LA DECOCTION DES FEUILLES DE *F. ANGUSTIFOLIA*

Les résultats de l'analyse statistique des indices mitotiques et le pourcentage des cellules aberrantes de la moelle osseuse des lots témoins (positif et négatif) et les extraits de feuilles de *F. angustifolia* à différentes doses sont représentés dans l'histogramme de la figure 19.



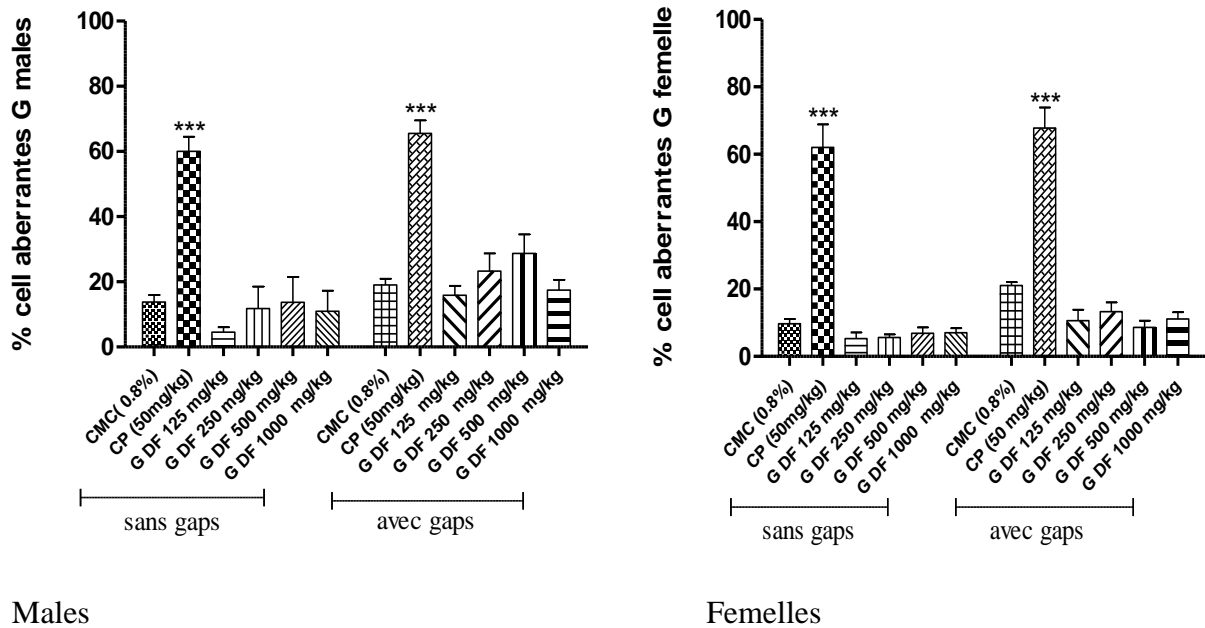


Figure (19): l'IM et pourcentage des cellules aberrantes chez les lots contrôle et l'extrait à différentes doses

Les résultats de l'analyse statistique de l'indice mitotique des extraits de feuilles de *F. angustifolia* par décoction à des doses de 125, 250, 500 et 1000 mg/kg observés chez les souris mâles et femelles sont non significatifs, comparativement au témoin négatif (CMC 0.8%), cela revient à dire que l'extrait est non cytotoxique. Il a été remarqué qu'il existe une légère différence entre les mâles et les femelles concernant la dose de 250mg/kg, cela peut être expliqué par le fait que les souris du lot qui fait exception ont atteint le poids requis pour l'expérimentation mais pas l'âge idéal.

En outre, les résultats obtenus pour le pourcentage de cellules aberrantes (avec et sans gaps) pour les deux sexes ont montré une différence hautement significative ($***P < 0.001$) entre les lots traités avec l'extrait de *F. angustifolia*, à des doses différentes, et les témoins positifs (CP 50mg/kg), ce qui suggère que les substances contenues dans l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* n'influencent pas sur les gènes des souris.

D'autre part l'analyse statistique comparative entre l'IM et le pourcentage des aberrations chromosomiques, aussi bien chez les mâles que chez les femelles, démontre que l'IM est inversement proportionnel au pourcentage des cellules aberrantes, en effet, chaque diminution significative de l'indice mitotique est accompagnée par une augmentation considérable du pourcentage de cellules aberrantes.

Le pourcentage des aberrations chromosomiques est exprimé dans le tableau II.

Les résultats du tableau ont permis d'examiner les différents types d'aberrations et d'analyser leurs fréquences pour les différentes doses de l'extrait, comparativement aux contrôles. Les résultats ont indiqué que les différentes aberrations sont moyennement exprimées comparativement au lot CP. Néanmoins, les polyploïdies sont fréquentes chez les mâles cela peut être lié à l'effet des composants de l'extrait en interférence avec l'état physiologique des mâles. Elles sont remarquables à des doses 250,500, et 1000mg/kg.

Des photographies des cellules métaphases « spread » ont été prises et rapportées dans la figure (20). Lors des observations microscopiques, plusieurs types d'anomalies ont pu être décelés.

1 : Gaps, 2 : Polyploidie

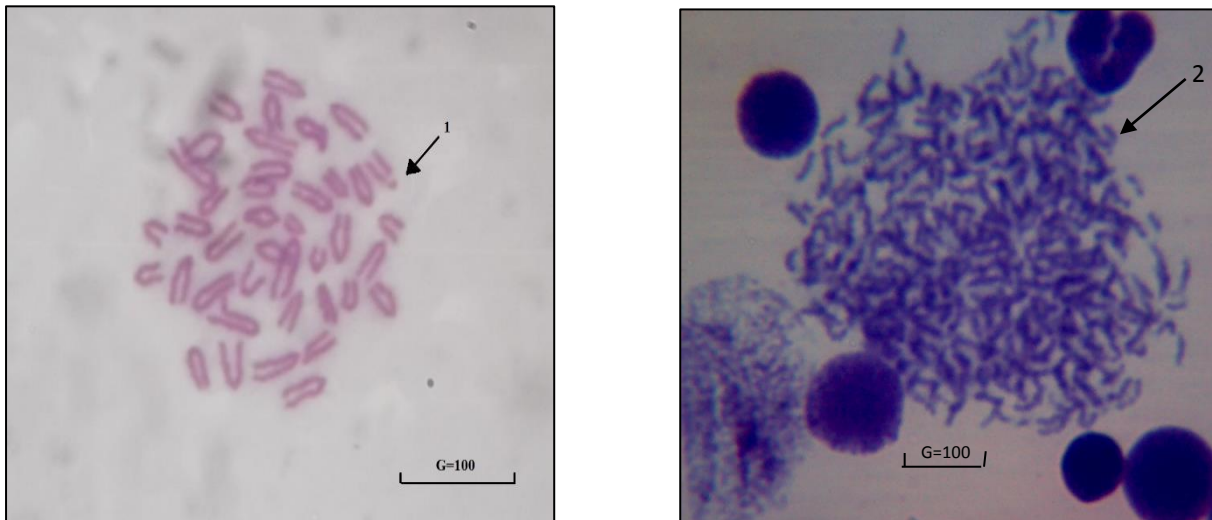


Figure (20): Photographies originales des aberrations détectées chez les lots traités avec les extraits

Tableau II: Aberrations chromosomiques dans les lots traités par l'extrait comparativement aux contrôles négatif et positif.

Doses (mg/kg)	Met.spread Number	Différentes aberrations chromosomiques							
		vide (Gap)	anneau (Ring)	Fragment	Del.chrom	Ass .cent	Pulvérisation	Polyplöid	
C-	♀	50	5	1	1	1	2	0	1
		50	9	1	3	1	0	0	0
		100	12	3	1	1	2	0	0
		100	7	3	11	7	0	0	0
	♂	100	8	5	12	10	4	0	0
		100	10	4	10	8	2	0	0
		50	15	1	2	1	1	0	1
		50	5	1	1	1	2	0	1
C+	♀	100	4	2	10	1	3	0	0
		100	18	0	36	29	6	1	0
		80	4	7	23	14	2	37	0
		100	6	5	17	10	2	78	0
		100	7	9	46	27	6	5	0
		100	27	20	24	27	10	8	2
	♂	100	6	3	16	3	9	5	0
		100	9	12	32	9	10	22	0
125		84	5	2	20	0	1	6	2
	♀	81	4	0	0	0	7	0	0
		100	13	0	1	1	3	0	1
		86	3	0	0	1	1	0	0
250	♂	100	8	2	0	0	1	0	4
		64	10	0	0	1	1	1	0
	♀	100	11	0	0	0	4	0	2
		100	9	0	1	0	5	0	2
		77	4	0	0	0	4	0	0
500	♂	100	21	6	1	2	3	2	7
		87	23	5	0	5	8	0	4
		67	10	2	0	0	3	0	2
1000	♀	98	3	0	0	0	4	0	1
		79	1	0	0	0	4	0	0
		96	2	1	1	1	4	0	2
		100	21	6	1	2	3	2	7
	♂	100	23	5	0	5	8	0	4
1000		100	10	2	0	0	3	0	2
	♀	56	2	0	0	0	2	0	0
		73	4	1	0	0	6	0	0
		96	8	0	1	1	3	0	0
	♂	100	19	6	2	5	3	0	5
	58	5	0	0	0	1	0	5	
	61	0	0	0	0	1	0	6	

III.4- EVALUATION DE L'EFFET DE LA DECOCTIONSUR LA GENOTOXICITE INDUITE PAR LE CYCLOPHOSPHAMIDE

Le traitement avec l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* à une dose de 250mg/kg combiné au CP (50mg/kg), comparativement à celle des contrôles a permis de mettre en évidence l'effet anti-génotoxique de cet extrait et les résultats sont montrés dans la figure (21).

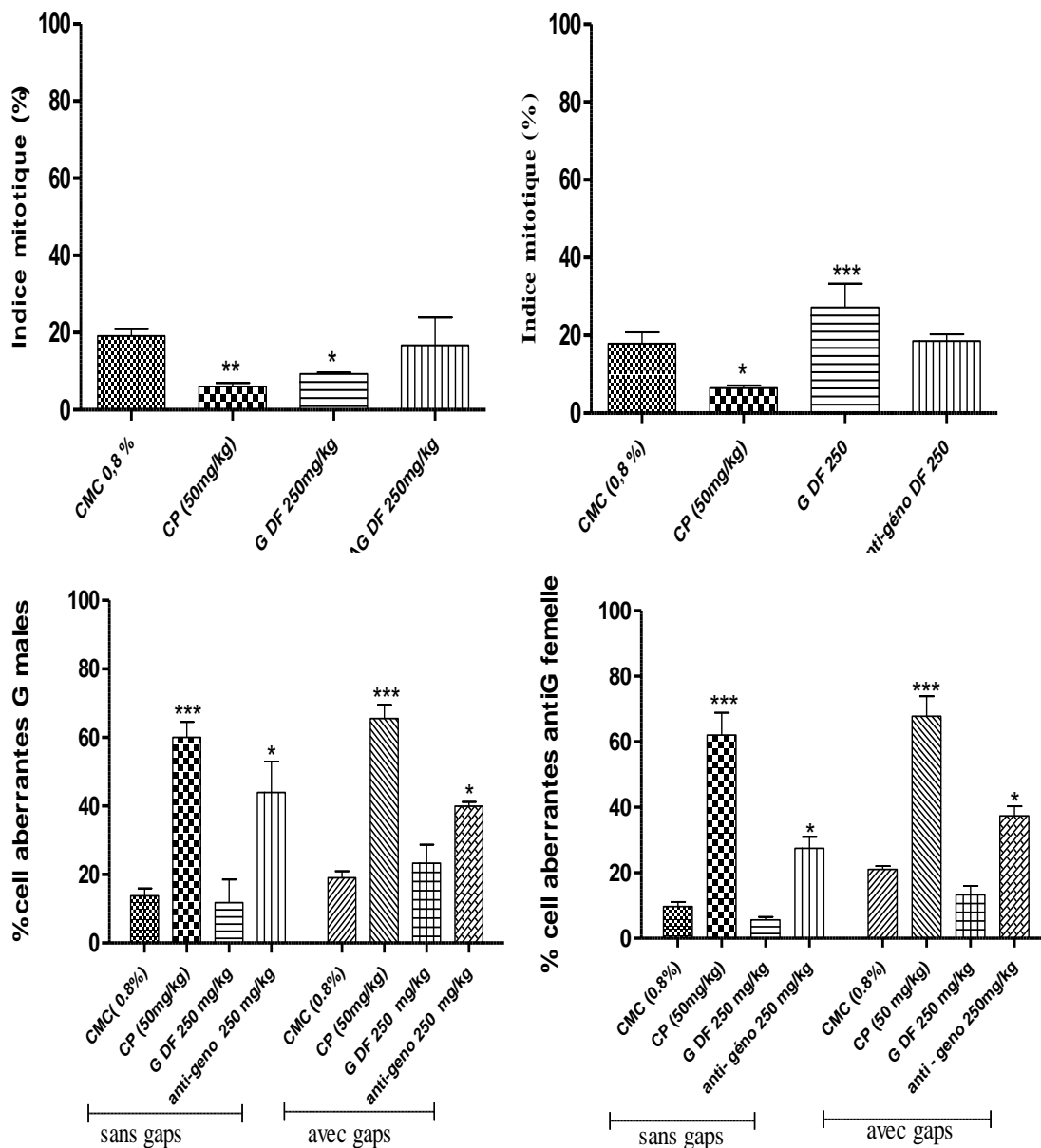


Figure (21): Indices mitotiques et pourcentages des cellules aberrantes chez les lots traités simultanément par la décoction des feuilles de *F. angustifolia* et le cyclophosphamide (l'agent mutagène)

D'après l'histogramme obtenu par l'analyse statistique de l'IM des souris mâles et femelles traitées avec le CP (50mg/kg) combiné avec les prétraitement par l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* à une dose de 250mg/kg, a montré des augmentations significatives (**P<0,01) de l'IM, ceci indique que cet extrait de feuilles a exercé un effet cytoprotecteur.

D'après les résultats obtenus les extraits de feuilles de *F. angustifolia* ont un effet protecteur et anti-génotoxique pour les deux sexes mâles et femelles.

Les résultats de l'analyse statistique des pourcentages des cellules aberrantes (avec et sans gaps) entre les deux sexes ont montrés une différence significative (**P<0.01) entre les contrôles positifs et celles traité avec l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* combiné à une injection intrapéritonéal de CP, cela montre que le pourcentage des aberrations est inférieur comparativement au lot CP (50mg/kg).

Tableau III : Aberrations chromosomiques dans les lots d'évaluation d'anti-génotoxicité.

Doses (mg/kg)	Met.spread Number	Différentes aberrations chromosomiques								
		vide Gap	anneau Ring	Fragment	Del.chrom	Ass .cent	Pulvérisation	Polyplôid		
C-	♀	50	5	1	1	1	2	0	1	
		50	9	1	3	1	0	0	0	
	♂	100	12	3	1	1	2	0	0	
		100	7	3	11	7	0	0	0	
		100	8	5	12	10	4	0	0	
		100	10	4	10	8	2	0	0	
		50	15	1	2	1	1	0	1	
		50	5	1	1	1	2	0	1	
	C+	♀	100	4	2	10	1	3	0	0
			100	18	0	36	29	6	1	0
80			4	7	23	14	2	37	0	
100			6	5	17	10	2	78	0	
♂		100	7	9	46	27	6	5	0	
		100	27	20	24	27	10	8	2	
		100	6	3	16	3	9	5	0	
		100	9	12	32	9	10	22	0	
		84	5	2	20	0	1	6	2	
		100	11	0	0	0	4	0	2	
250	♀	100	9	0	1	0	5	0	2	
		77	4	0	0	0	4	0	0	
		100	21	6	1	2	3	2	7	
	♂	87	23	5	0	5	8	0	4	
		67	10	2	0	0	3	0	2	
		100	10	1	14	0	3	5	2	
CP + extrait250	♀	100	11	0	20	10	4	0	0	
		58	5	5	15	4	3	0	0	
		85	19	5	29	19	4	4	8	
	♂	80	3	0	22	1	1	2	1	

Quelques aberrations sont apparues et rapportées lors du traitement combiné entre le CP et l'extrait de feuilles de *F. angustifolia*. Les résultats illustrés dans le tableau indiquent la présence d'un nombre réduit de fragments variant entre (14 et 29), comparativement au contrôle positive qui présente une forte expression en fragments (10 à 48). Les résultats indiquent que les dommages génétiques dans la moelle osseuse de souris induits par le CP étaient plus fréquents que ceux du traitement par l'extrait (250 mg/kg). Cela peut s'expliquer par le fait que ce dernier a réduit les dommages résultant de l'action du mutagène chimique. L'analyse microscopique de quelques aberrations détectées dans les lots du traitement combiné (test d'anti-génotoxicité) sont présentées dans les figures suivantes :

1 : Polyploïdie, 2 : Délétions chromosomiques, 3 : Fragments

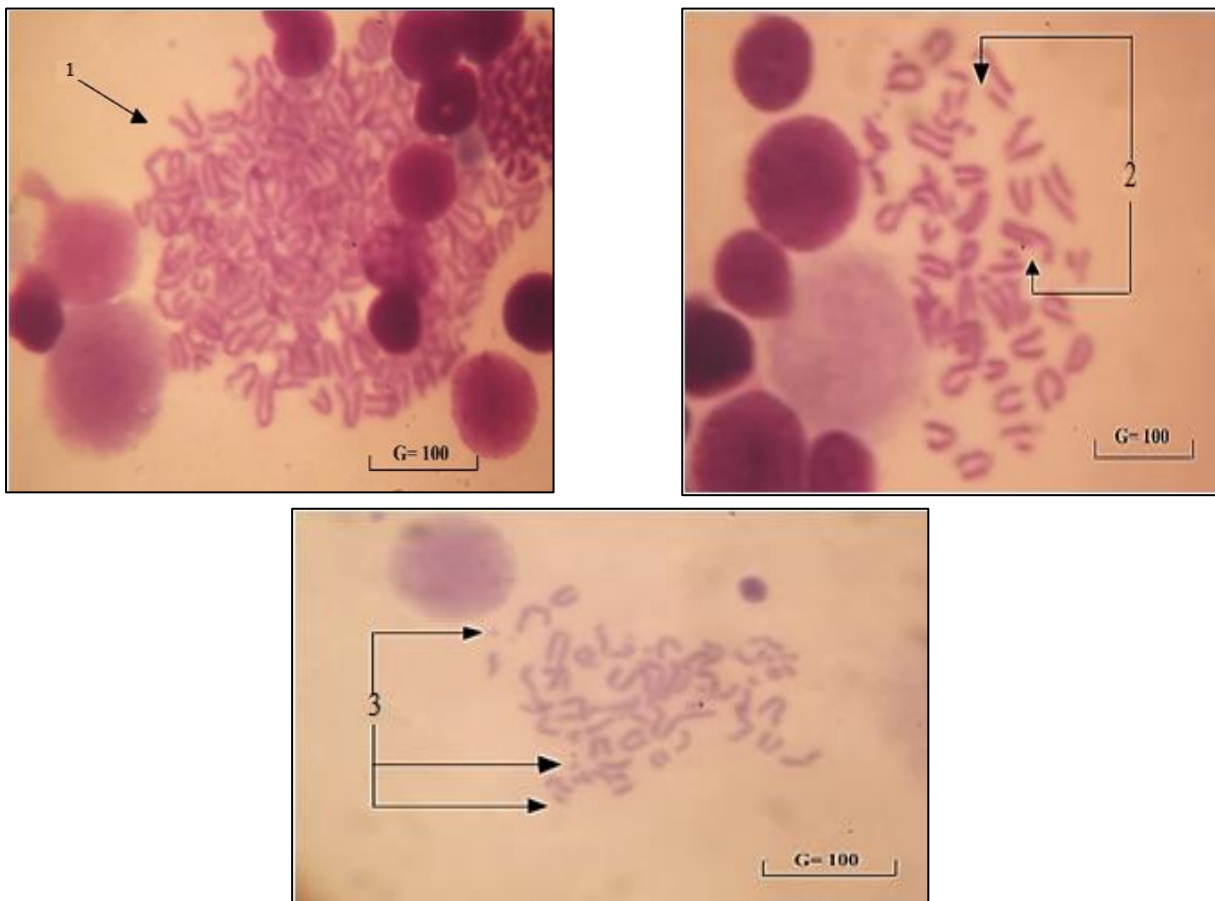


Figure 22: Photographies originales des aberrations détectées chez les lots des tests d'anti-génotoxicité

III.5- DISCUSSION DES RESULTATS

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 sur les feuilles de *F. angustifolia* utilisées traditionnellement dans plusieurs traitements dans différentes régions du monde pour leurs effets purgatifs, de la constipation, de l'hydropisie, de l'arthrite, de la douleur rhumatismale et de la cystite (**Gifa, 2012**). Les feuilles sont employées en tant qu'un anti-inflammatoire, antipyrétique. Ces activités biologiques intéressantes ont été attribuées principalement à ses métabolites secondaires, particulièrement les flavonoïdes, les coumarines et les secoiridoids (**Kostova et al., 2006**).

Dans cette étude, l'extraction de ces métabolites a été réalisée par la décoction considérée comme une technique adéquate pour obtenir un maximum de substances aqueuses, mais aussi pour son utilisation traditionnelle.

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. Par conséquent, il est important d'évaluer leurs propriétés génotoxiques et leur potentiel protecteur du matériel génétique (**Rani et al., 2005 ; Fernandes et al., 2007**)

A cet effet, le test des aberrations chromosomiques s'avère le mieux caractérisé et le premier validé par le Programme International sur la Sécurité Chimique (PISC, OMS). C'est l'une des méthodes les plus anciennes d'évaluation des lésions génotoxiques liées à des expositions génotoxiques (**Cabrera et Rodriguez, 1999 ; Rani et al., 2005**). En plus, il nous renseigne sur les paramètres communs de la cytogénétique tels que l'indice mitotique et les anomalies chromosomiques. L'essai d'aberration chromosomique *in vivo* est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations structurales dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs qui ont le même schéma métabolique que celui de l'Homme.

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**), et servirait ainsi pour évaluer la cytotoxicité de plusieurs agents (**Chukwujekwu et Van Staden, 2014**).

Le cyclophosphamide est le xénobiotique le plus ancien dans le traitement chimiothérapique, il se dissout facilement dans l'eau et légèrement soluble dans l'alcool (**Arenaz *et al.*, 1983**).

C'est une substance qui n'est active qu'après son métabolisme au niveau hépatique par le CYP 450, et peut agir directement au niveau de l'ADN, elles possèdent un ou plusieurs groupements alkyles, qui va créer des liaisons covalentes avec des groupements électro-négatifs des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (**Pette *et al.*, 1995**). Ils bloquent ainsi la réplication de l'ADN, et la séparation des brins nécessaire à la transcription de celui-ci, ce qui conduit à une mort cellulaire.

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 (**Jane *et al.*, 2010**).

Lors du traitement des souris albinos avec des agents mutagènes chimiques, des mauvaises ségrégations chromosomiques peuvent avoir lieu, ceci conduirais à la diminution de l'indice mitotique. Cette diminution peut être interprétée comme une mort cellulaire.

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 (**Preston *et al.*, 1987**). 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 de l'ADN.

Le CP a diminué l'IM indiquant une division cellulaire ralentie, cela pourrait être lié à la création de ponts (liaison covalente) entre les deux brins d'ADN par alkylation, ce qui empêche la réplication de l'ADN et peut agir à n'importe quel moment du cycle cellulaire.

Un des métabolites de CP présente une affinité importante avec les protéines cellulaires d'où le système de réparation de l'ADN est altéré, ce qui explique l'apparition en nombre important des aberrations, d'où le pourcentage élevé d'aberrations chromosomiques accompagnants les diminutions des indices mitotiques. Cette augmentation est un indicateur de génotoxicité, conduisant la cellule à l'apoptose (**Moore, 1991**).

Elles peuvent être dues au blocage de la synthèse de l'ADN ou à l'inhibition de la formation des fuseaux mitotique (**Brown et al., 2000**).

Les aberrations chromosomiques observées lors du traitement avec le CP sont généralement : des fragmentations ; des cassures et des pulvérisations, ceci explique la diminution de la prolifération cellulaire. L'aberration chromosomique de type fragmentation est l'anomalie la plus fréquente, elle peut être dû à la condensation prématurée des chromosomes pendant l'interphase, ayant comme conséquence la condensation des chromosomes partiellement repliés, qui apparaissent en tant que blocs réduits en fragments des chromosomes (**Cheng et al., 1993**).

L'effet protecteur exercé par l'extrait des feuilles de *F. angustifolia* vis-à-vis de ces fragmentations induites par le CP peut être lié à l'affinité des métabolites de *F. angustifolia* et les biomolécules des cellules en division de la moelle osseuse.

La quercétine a été récemment démontrée efficace en prévention de la prolifération cellulaire et de la carcinogénèse, dans de nombreux autres modèles (**Lynnette et al., 2013**). Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'inhibition de la cancérogenèse par la quercétine. Les topoisomérases sont des enzymes entraînant des torsions de l'ADN pendant la réplication et la transcription, responsables du développement de la tumeur. La quercétine est un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales et possède aussi des propriétés anti-inflammatoires (**Lynnette et al., 2013**).

La curcumine a la capacité de moduler l'expression des proto-oncogènes, des gènes responsables de la prolifération tumorale (c-myc). Elle inhibe aussi l'activité de la protéine kinase C et de la tyrosine kinase des cellules tumorales (médiateurs de signal cellulaire), bloquant ainsi le signal de transduction (transfert du message) de ces cellules et induisant par ce mécanisme leur apoptose dans les phases de promotion et de progression.

Dans le test anti-génotoxique, l'indice mitotique a marqué une augmentation significative ainsi qu'une diminution du pourcentage d'aberrations, ceci prouve un effet anti-génotoxique de cet extrait. Ce résultat est dû aux composés contenus dans cet extrait ayant le pouvoir de protéger les cellules de la souris, particulièrement contre les dommages induits par le CP.

A partir de ces résultats on déduit que cet extrait brut de composition complexe, de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, abritent des composés qui ont pu interférer avec les composantes du cycle cellulaire et induire un effet anti-génotoxique.

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 anti-génotoxique. Il est possible que ces composés ayant Des propriétés anti-génotoxiques participent à l'effet inhibiteur direct des mutagènes. Les flavonoïdes peuvent inhiber les mutations provoquées grâce au pouvoir de piégeage des électrophiles. Une corrélation entre les antioxydants et les activités anti-génotoxiques des extraits de plante a été rapporté (**Gernand et al.,2005**)

Les résultats de cette étude a mis en évidence un pouvoir anti-génotoxique de l'extrait de *F. angustifolia* contre les effets délétères du cyclophosphamide, ce qui suggère l'utilité de cet extrait en probable association dans les traitements chimiothérapeutiques, afin de combattre et de protéger contre ses effets secondaires. En effet, il a été démontré par des études précliniques *in vivo* que l'administration du CP pour des souris accompagnée de l'emoxipin corrige la cytotoxicité de ce dernier (**Siprova et al., 2008**).

Conclusion

Cette étude a été réalisée afin de contribuer à l'étude des effets de l'extrait aqueux de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et la détermination de leur potentiel génotoxique ou antigénotoxique, par l'usage d'un modèle *in vivo* (Souris NMRI).

L'utilisation de l'agent toxique indirecte qui est le cyclophosphamide (50mg/kg) comme témoin positif a montré un effet génotoxique sur les souris, alors que les résultats de la prise des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Fraxinus angustifolia* n'ont révélé aucun effet génotoxique.

Le test anti-génotoxique réalisé par une combinaison entre l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et le cyclophosphamide (50mg/L) sur les souris a montré des résultats prometteurs, ceci après une analyse statistique de l'indice mitotique et du taux de cellules aberrantes issues des observations microscopiques, l'extrait aqueux de feuilles de *Fraxinus angustifolia* à 250mg/kg a augmenté l'indice mitotique et a réduit le nombre de cellules aberrantes observées dans le contrôle positif.

Le résultat obtenu du test d'anti-génotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles de *Fraxinus angustifolia* peut être exploité dans différentes activités biologiques, notamment l'activité anticancéreuse, par combinaison avec un ou plusieurs agents chimiques, afin de diminuer leurs effets cytotoxiques au sein des cellules cancéreuses et saines.

En perspectives, il serait intéressant de compléter ce travail par d'autres études :

- Reprendre ce test avec d'autres observateurs, d'autres tests et élargir le spectre des doses en privilégiant les doses les plus faibles pour un meilleur intérêt pharmaceutique.
- Réaliser une coloration différentielle pour mettre en évidence les échanges des chromatides sœurs (les points de cassures), Ce qui implique que ceci est un indice qui pourra déceler le nombre d'échanges et la fréquence des cassures chromosomiques
- Identifier les métabolites impliqués dans cette activité et déterminer leurs mécanismes et cible d'action dans l'optique de son usage clinique.

À

- **Aeschlimann, C., Kupfer, A., Schefer, H., Cerny, T. (1998).** Comparative pharmacokinetics of oral and intravenous ifosfamide/mesna/methylene blue therapy. *Drug Metab Dispos*, 26: 883–890.
- **Agner, J., Falck, J., Lukas, J. Bartek, J. (2005).** Differential impact of diverse anticancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway. *Exp Cell Res*, 302: 162-9.
- **Akinboro, A., Bakare, A.A. (2007).** Cytotoxic and genotoxic effect of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470-475.
- **Alis, c., Hosny, M., Khalifa, T., Lahloub, M.F. (1996).** A secoiridoid glucoside from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry*, 41 (6), 1557–1562.
- **Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., & Lee, F. D. (1973).** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8), 2281-2285.
- **Arenaz, A., Nilan, A., 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.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debache, N., Atmani, D. (2009).**Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* 122, 303-309.
- **Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, K.K., Atmani, DJ., Verpoorte, R., Hae Choi, Y (2016).** Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 13 : 1-13.

B

- **Baba-Aissa, F., (2011).** Encyclopédie des Plantes Utiles. El-Maarifa, Alger, pp.157–158.
- **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.

- **Beloued, A., (1998).** Plantes Médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaires*, Alger, pp. 277.
- **Beijnen, J. H. (2000).** Evaluation of the autoinduction of ifosfamide metabolism by population pharmacokinetic approach using NONMEM. *Br. J. Clin. Pharmacol*,49: 555–561.
- **Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K., 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.
- **Beraud, J. (2001).** “Biologie Général “L’importance d’étude de cycle cellulaire. *Technique de cytométrie de flux*, 38 :212-304.
- **Berrigan, M.J., Struck, R.F., Gurtoo, H.L. (1987).** Lipid peroxidation induced by cyclophosphamide. *Cancer Biochemistry and Biophysics*, 9: 265-270.
- **Boddy, A. V., Yule, S.M. (2000).** Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clin Pharmacokinet*, 38:291–304.
- **Bodell, W.J. (2009).** DNA alkylation products formed by 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea as molecular dosimeters of therapeutic response. *J.Neurooncol*, 91:257-264.
- **Bray L. (2010).** Interactions Végétales: la Guerre Biologique est Déclarée. Bulgarian Fraxinus species. *Biochem SystEcol*, 25:271-274.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition, la voisier, Paris, 1120 p.

τ

- **Cabrera,G., Rodriguez, D. (1999).** Genotoxicity of soil from farmland irrigated with waste water using three plant bioassays. *Mutat Res*, 426: 211-214.
- **Çalış, I., Hosny, M., Khalifa, T., Nishibe, S. (1993).** Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry*, 33:1453-1456.
- **Carla, R., Andrighetti-Fr, O., Jadel, M., Regina, V., Antonio, B., Creczynski-Pasa, R.M., Barardi, Claudia, M.O. (2006).** *In vitro* testing for genotoxicity of violace in assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutation Research*, 603, 97–103.

- **Chevalier, A. (1927).** Les frênes comme plantes fourragères dans l'Afrique du Nord. In: Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale. 7eme année, bulletinno. 71, juillet 1927. pp. 467-471.
- **Chène, P. (2003).** Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature Rev Cancer*, 3: 102-9.
- **Chhipa, R.R., Singh, S. (2006).** Doxycycline potentiates antitumor effect of cyclophosphamide in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 202:268–77.
- **Chukwujekwu, J.C., 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.
- **Cimino, MC. (2006).** Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetictoxicology testing for regulatory purposes. *Environ Mol Mutagen*, 47:362-390.
- **Collins, A. R. (2004).** "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations". *Mol Biotechnol*, 26 (3): 249–61.

D

- **Dail, H., Prá, D., Silva-Stenico, M., Rieger, A., Frescura, D., Fiore, M.F., 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.
- **De Jonge, M. E., D.R. Huitema, A., Rodenhuis, S., Beijnen, J.H.(2005).** Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clinpharmacokinet*, 44 (11): 1135-1164.
- **Dhawan, A., Bajpayee, M., 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.
- **Djerroumi, A., Nacef, M., (2004).** 100 Plantes Médicinales d'Algérie. Palais de livre, pp. 45–110.
- **Dobrowolska, D., Hein, S., Oosterbaan, A., Wagner, S., Clark, J., Skovsgaard, J.P. (2011).** A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. *Forestry*, 84: 133-148.

£

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

ƒ

- **Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. (1986).** Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 64(2) 159-175.
- **Fernandes, L.M., Garcez, W.S., Mantovani, M.S., Figueiredo, P.O., Fernandes, C.A., Garcez, F.R., 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.
- **Fornace, A.J., Kohn, K.W. (1976).** DNA-protein cross-linking by ultraviolet radiation in normal human and xerodermapigmentosum fibroblasts, *Biochim.Biophys. Acta*, 435, 95-103.
- **Friedberg, E.C. (2003).** DNA damage and repair. *Nature*, 421: 436-40.

ƒ

- **Gadano, A. (2002).** *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 8741(01) 00418-4.
- **Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Bruss, C., Kumlehn, J., Matzk, F., Houben, A. (2005).** Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell* 17(9):2431–2438.
- **GIFA. (2012).** Guide Illustré de la Flore Algérienne: (IGAF) Illustrated Guide of the Algeria n Flora. Les presses de l'Imprimerie Moderne de l'Est, Paris, pp.51.
- **Gilbert, C.J., Petros, W.P. (1998).** Pharmacokinetic interaction between ondansetron and cyclophosphamide during high-dose chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 42: 497–503.

- **Gilman, A., Philips, F.S. (1946).** The biological actions and Therapeutic applications of The B-chloroethyl amines and sulfides. *Sciences*, 103:409-415.
- **Gonçalves, M., Monteiro, M., Oliveira, J., Oliveira, S., Pereira, E., Maia-Gonçalves, A., Lencastre, L. (2013).** Lactic acidosis in patients under metformin therapy. *European Journal of Internal Medicine*, 93: 2-5.
- **Goren, M. P. (1996).** Oral administration of mesna with ifosfamide. *Semin. Oncol*, 23:91–96.

H

- **Harborne, J.B. (1993).** The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. In: *Inc CP, editor.* p. 241-5.
- **Hartmann, A., Schumacher, M., Plappertt, U., Lowe, P., Suter, w., Mueller, L. (2004).** Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 19(1): 51-59.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleu, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et Herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6: 673-681.
- **Hosny, M., Çaliş, I., Nishibe, S. (1991).** Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Planta Med*, 57:S2 A81.
- **Huang, Y., Li, L. (2013).** DNA crosslinking damage and cancer – a tale of friend and foe. *Translational cancer research*, 2(3):144-154.

I

- **Jagetia, G.C. (2004).**The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain herbal formulations in vitro: a preliminary study. *Phytother Res*, 18(7): 561-5.
- **Jane, M., Boeiraa, R.F., Andresa, H., Betti, C., Gustavo, P., Luciana de A. Lacerdad, P.R., Barbosad, F.H.D., Gonzálezd, A.M., Correae, D.D., Marília, P., Dall’Albaa, A. P., Pedroso, Grace, G., Juliana, S., Stela, M.K. (2010).**Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passifloraalata* Curtis (Passifloraceae) *Journal of Ethnopharmacology*, 128,526–532.
- **Jensen, S.R., Franzyk, H., Wallader, E. (2002).** *Phytochemistry*, 60:213.

K

- **Kardong, D., Upadhyaya, S., Saikia, L.R. (2013).** Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn. *Journal of Pharmacy Research*, 6: 179-182.
- **Kerbusch. (2001).** Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamic of ifosfamide and its metabolites. *Clinical pharmacokinetics*, 40 (1): 41-62.
- **Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P. (2011).** A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* génotoxins. *Mutation Research*, 721: 27–73.
- **Kostova, I., Iossifova, T. (2007).** Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*, 78: 85–106.
- **Kovalchuk, O., Arkhipov, I., Telyuk, .A., Hohn, P., 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.
- **Krumbhaar, E.B., Krumbhaar, H.D. (1919).** The blood and bone marrow in yellow gas (mustard gas) poisoning changes produced in bone marrow in fatal cases. *J Med Res*, 40: 497-508.
- **Kumar, V.P., Venkatech, Y.P. (2016).** Alleviation of cyclophosphamide-induced immunosuppression in Wistar rats by onion lectin (*Allium cepa* agglutinin). *Journal of ethnopharmacology*, 9:1-31.

L

- **Levy, A., Albiges-Sauvin, L., Massard, C., Soria, J.C., Deutsch, E. (2011).** Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques. *Bulletin du cancer*, 98: 1037-1039.
- **Lynnette. R., Ferguson (2000).** Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475: 89–111.

M

- **Mahdavi, V., Roghani, M., Baluchnejadmojara, T. (2008).** Mechanisms responsible for the vascular effect of aqueous *Trigonell afoenumgraecum* leaf extract in diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(2):59- 63.
- **Mazumdar, M., Giri, S., Giri, A. (2011).** Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vivo, *Mutation research*, 721: 147-152.
- **Meijer L, Jezequel A, Roberge M. (2003).**“Cell Cycle Regulators as Therapeutic Targets”. *Progress in Cell Cycle Research*, vol. 5, Editions “Life in Progress”, *Roscoff*, p. 549.
- **Meijer, L. (2006).** The cell division cycle and its regulation. *Bull Cancer*, 41-53.
- **Mesi, A., Kopluku, D. (2013).** Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of TwoPesticides on *Allium cepa* L. *Procedia Technology*, 8: 19 – 26.
- **Millard, J.T., Weidner, M.F.,Kirchner, J.J., Ribeiro, S., Hopkins, PB. (1991).** Sequence preferences of DNA interstrand crosslinking agents: quantitation of interstrand crosslink locations in DNA duplex fragments containing multiple crosslink ablesites. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 8.
- **Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000).**The Ames *Salmonella/* microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29–60.
- **Moore, M.J. (1991).** Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*, 201: 194–208.
- **Moulaoui, K. (2015).** Evaluation des activités biologiques in vitro et in vivo des extraits de *Fraxinusangustifolia*. thèse en vue de l’obtention du diplôme de doctorat, Biochimie appliquée, Université de Béjaia, p. 44.
- **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.

N

- **Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S. (2006).** Formation and repair of interstrand cross-links in DNA .*Chem Rev*, 106 (2): 277-301.

P

- **Peterson, J.R, Mitchison, T.J. (2002).** Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem Biol*, 9: 1275-85.
- **Pette, M., Gold, R., Pette, D. F., Hartung, H. P., Toyka, K. V. (1995).** Mafosfamide induces DNA fragmentation and apoptosis in human T-lymphocytes. A possible mechanism of its immunosuppressive action. *Immuno pharmacology*, 30:59–69.
- **Pommier, Y., Kohn, K.W. (2003).** Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine/ Sciences*, 19: 173-86.
- **Pourquier, P., Robert, J. (2011).** Vue générale de la réparation de l'ADN. *Bull Cancer*, 98: 229-37.
- **Pratt, W.B. (1994).** Covalent DNA-binding drugs. In: *The Anticancer Drugs*. Oxford University Press: New York .p. 108-132.
- **Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., and Shelby, M.(1987).** Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res*, 189, 157-165.
- **Pullman, A., Pullman, B. (1981).** Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Q Rev Biophys*, 14(3): 289-380.

R

- **Rani, G., Kaur, K., Wadhwa, R., Kaul, S.C. and Nagpal, A. (2005).** Evaluation of the antigenotoxicity of leaf extract of *Aschwagandha*. *Food chemical Toxicology* 43. P. 95-98.
- **Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux, édition française, 526 :321-327 .

S

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

- **Schlezinger, J.J., White, R.D., Stegeman, J.J. (1999).** Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Molecular Pharmacology*, 56: 588-597.
- **Shiloh, Y. (2003).** ATM and related protein kinases: safe guarding genome integrity. *Nature Rev Cancer*, 3: 155-68.
- **Spigno, G., Tramelli, L., 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.
- **Sram, R.J., Rossner, P., Beskid, O., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Solansky, I Albertini, R.J.(2007).** Chromosomal aberration frequencies determined by conventional methods: Parallel increases over time in the region of a petrochemical industry and throughout the Czech Republic. *Chem Biol Interact*, 166:239-244.
- **Stewart, Z.A., Westfall, M.D., Pietenpol, J.A. (2003).** Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Biol*, 24: 139-45.
- **Svoboda, K. P., (2000).** Secretory structures of Aromatic and medicinal plant. Microscopix Publications. Powys, UK, 4p.

T

- **Thurston, D.E. (2007),** Chemistry and Pharmacology of anticancer drugs. *CRC Press*, 97(12): 1713.
- **Timothy, O. M., Idu, D.I., Olorunfemi, O., Ovuakporie-Uvo. (2014).** Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacinatrichantha Oliv.* *South African Journal of Botany*, 91, 71–74.
- **Tsai, J. H., Choe, J. H., Lim, J. M. C., Acorda, E., Chan, N. L., Taylor, V., Tu, S.P. (2004).** Developing culturally competent health knowledge: Issues of data analysis of cross-cultural, cross-language qualitative research. *International Journal of Qualitative Methods*, 3(4).

W

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

- **Wang, D., Lippard, S.J. (2005).** Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discover*, 4(4): 307-20.

X

- **Xiano, H., Wang, J.X., Wang, G., Wang, J.Y., 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.

Y

- **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.
- **Yuet Ping, K., Darah, I., Sasidharan, S. (2012).** Cytotoxicity and genotoxicity assessment of *Euphorbia hirtain* MCF-7 cell line model using comet assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 24: 139-45.

Z

- **Zhang, J., Tian, Q., Yung Chan, S., Chuen Li, S., Zhou, S., Duan, W., Zhu, Y.Z. (2005).** Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev*, 37:611-703.

Annexes

Annexe N° 01 : Equipement et matériels de laboratoire

- Broyeur électrique (KIKA labo technik)
- Balance de précision (RADWAG)
- Plaque chauffante agitatrice (VELP)
- Bain ultrasons (RAYPA),
- Etuve (ECOCELL-MMM)
- Bain marie (MEMMERT)
- Centrifugeuse (SIGMA)
- Microscope optique (ZEISS) a grossissement (X10, X40, X100)
- Lyophilisateur Alpha (CHRIST)

Annexe N° 02 : Produits chimiques

- Cyclophosphamide monohydrate ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$)
- Colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$)
- Chloroforme ($CHCl_3$)
- Chlorure de potassium (KCl),
- Acide acétique ($C_2H_4O_2$)
- Fixateur préparé à partir de (1v/3v) d'acide acétique et de méthanol
- L'éthanol à 70% pour rinçage et stérilisation
- Colorant (Giemsa) a 10%
- Colle (euro-kit)
- Xylène (C_8H_{10})

Annexe N° 03 : Les différents types de cellules dénombrées chez les souris femelles + les cellules aberrantes + l'IM (%)

Souris	dose	Cell division	interphase	Met.spred	Aberration chromosomique							IM
					Gap	Ring	Fragment	Del.chrom	Ass.cent	Pulverisation	Polypléid	
GDFF♀ (6.6')	1000	535	2338	56	2(2cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	2(2cell)	0	0	18,621
GDFF♀ (1.1')	1000	1165	3255	73	5(4cell)	1(1cell)	0(0cell)	0(0cell)	10(6cell)	0	0	26,357
GDFF♀ (5.5)	1000	1429	4771	96	12(8cell)	0(0cell)	1(1cell)	1(1cell)	3(3cell)	0	0	23,048
GDFF♀ (1.1)	500	2253	7919	98	3(2cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	6(4cell)	0	1	22,149
GDFF♀ (3'.3)	500	515	2740	79	1(1cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	6(4cell)	0	0	15,821
GDFF♀ (5'.5)	500	2830	5355	96	5(2cell)	1(1cell)	1(1cell)	1(1cell)	4(4cell)	0	2	34,579
GDFF♀ (1.1')	250	3841	7782	100	16(11cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	6(4cell)	0	2	33,046
GDFF♀ (2.2')	250	1597	8980	100	11(9cell)	0(0cell)	1(1cell)	0(0cell)	5(5cell)	0	2	15,098
GDFF♀ (6'.6)	250	2560	5085	77	7(4cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	6(4cell)	0	0	33,485
GDFF♀ (4.4')	125	1518	8331	81	5(4cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	10(7cell)	0	0	15,412
GDFF♀ (1.1')	125	1252	5321	100	15(13cell)	0(0cell)	1(1cell)	1(1cell)	6(3cell)	0	1	19,047
GDFF♀ (2'.2)	125	1116	5223	86	12(8cell)	0(0cell)	0(0cell)	1(1cell)	3(2cell)	0	0	17,605
ADFF♀ (5.5')	250	951	8129	100	13(11cell)	0(0cell)	9(20cell)	19(10cell)	4(4cell)	0	0	10,473
ADFF♀ (3.3')	250	1219	4654	100	12(10cell)	1(1cell)	69(14cell)	0(0cell)	5(3cell)	5	2	20,756
ADFF♀ (1.1')	250	1317	4082	58	7(5cell)	6(5cell)	50(15cell)	6(4cell)	3(3cell)	0	0	24,393

Annexe N° 04 : Les différents types de cellules dénombrées chez les souris mâles + les cellules aberrantes + l'IM (%)

Souris	Dose	Cell division	interphase	Met.spred	Aberration chromosomique							IM
					Gap	Ring	Fragment	Del.chrom	Ass.cent	Pulverisation	Polypléid	
GDFF♂ (4.4')	1000	2384	22062	100	34(19cell)	7(6cell)	2(2cell)	14(5cell)	5(3cell)	0	5	10,8
GDFF♂ (3.3')	1000	2550	8624	58	12(5cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	1(1cell)	0	5	22,82
GDFF♂ (2.2')	1000	2988	15254	61	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	0(0cell)	2(1cell)	0	6	16,38
GDFF♂ (1.1')	500	1420	11529	100	29(21cell)	9(6cell)	1(1cell)	2(2cell)	5(3cell)	2	7	10,96
GDFF♂ (2.2')	500	2974	7298	100	49(23cell)	7(5cell)	0(0cell)	13(5cell)	10(8cell)	0	4	28,9
GDFF♂ (4.4')	500	3523	24060	100	15(10cell)	2(2cell)	0(0cell)	0(0cell)	7(3cell)	0	2	12,77
GDFF♂ (1.1')	250	1405	14959	100	8(5cell)	2(2cell)	0(0cell)	0(0cell)	2(2cell)	0	12	8,58
GDFF♂ (3.3')	250	1633	15575	87	49(20cell)	0(0cell)	1(1cell)	1(1cell)	2(2cell)	0	6	9,49
GDFF♂ (4.4')	250	1341	12426	67	19(7cell)	0(0cell)	0(0cell)	2(1cell)	0(0cell)	0	5	9,74
GDFF♂ (2.2')	125	3576	16687	100	11(8cell)	3(2cell)	0(0cell)	0(0cell)	1(1cell)	0	4	17,64
GDFF♂ (5.5')	125	2067	12304	64	16(10cell)	0(0cell)	0(0cell)	2(1cell)	1(1cell)	0	0	14,38
AGDFF♂ (5.5')	250	860	8280	85	36(19cell)	5(5cell)	88+9c>10(29cell)	75(19cell)	6(4cell)	4	8	9,4
AGDFF♂ (7.7')	250	1679	5319	80	17(12cell)	0(0cell)	55(22cell)	34(19cell)	4(4cell)	1	0	23,99

Résumé

Fraxinus angustifolia, une plante appartenant à la famille des *Oleacées*, a utilisation très ancienne comme un remède naturel contre plusieurs maladies. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet génotoxique ou anti-génotoxique de l'extrait aqueux de feuilles de *F.angustifolia* contre l'effet de cyclophosphamide (CP) par le test des aberrations chromosomiques, *in vivo*. Des souris réparties en plusieurs groupes mâles et femelles, puis gavés par différentes doses de l'extrait 125, 250, 500, 1000mg/kg. Les groupes sélectionnés pour l'anti-génotoxicité ont reçu le CP (50mg/kg) (i.p) 24h avant le sacrifice. Les groupes utilisés pour l'anti-génotoxicité à diminué significativement (**P<0.05) le taux des aberrations chromosomiques (AC), comparativement aux groupes CP, qui a augmenté significativement (**P<0.05) les dommages de l'ADN. Ainsi cette étude révèle l'activité anti-génotoxique de l'extrait de décoction de feuilles de *F.angustifolia* contre la toxicité induite par le CP.

Mots clés : *Fraxinusangustifolia*, ,Génotoxicité, Aberration chromosomique (AC), cyclophosphamide (CP).

Abstract

F. angustifolia plant from oleaceae family, known for its medicinal importance since ancient times. Every part of the plant has been used for curing different diseases. In the present investigation, anti-génotoxic effect of *F.angustifolia* aqueous leaves extract against cyclophosphamide (CP) has been evaluated using *in vivo* Chromosomal aberrations (CA) assay. Mice were categorized in two different groups, males and females. They were orally administered with different doses of *F.angustifolia* (125, 250, 500, 1000 mg/kg body weight) 24 hours prior to CP treatment. The CP treated group, vehicle alone group and *F.angustifolia* control group were also included. *F.angustifolia* pretreatment resulted in a significant decreased (**P<0.05) frequency of CA, whereas CP treated groups showed significant increase (**P<0.05) in DNA damage in the bone marrow as evidenced by an increase in the number of CA. Thus, the present study revealed the anti-genotoxic activity of *F.angustifolia* leaves extract against induced by CP génotoxicity.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, génotoxicity, Chromosomal Aberration (CA), cyclophosphamide (CP).