

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
Laboratoire de Biochimie Appliquée (L.B.A)



Mémoire de Master

Filière: Sciences biologiques

Option: Pharmacologie moléculaire

Thème

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

Présenté par : Kouache Ouissam et Zidat Samira

Composition du jury

M ^r M.TACHERFIOUT	Maitre Assistant A, UAMB, Bejaia	Président
M ^r D. ATMANI	Professeur, UAMB, Bejaia	Promoteur
M ^r N. BELKACEM	Maitre Assistant A, UAMB, Bejaia	Examineur

Année Universitaire : 2015/2016



REMERCIEMENTS

Avant et après tout, nous remercions notre bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné du courage, la patience et de la santé pour bien continuer et réaliser ce modeste travail

Nous tenons à remercier notre promoteur Mr ATMANI D. Mme ATMANI D. de nous avoir accordé l'accès au laboratoire de Biochimie Appliquée.

*Nos remerciements s'adressent à Mr ATMANI d'avoir accepté de nous encadrer et de nous pousser d'avancer par ses **préventions tous les jours** au laboratoire Biochimie Appliquée malgré son temps précieux et ses autres travaux qui les attend.....*

Nous remercions particulièrement à M^{lle} AYOUUNI K. Son aide, ses conseils, ses orientations et sa grande gentillesse.

Nos remerciements et considérations sont exprimés à Mme BERBOUCHA-RAHMANI M. et M^{lle} BOUGUELLID G. pour leur amitié, leur disponibilité et tous qu'elles nous ont appris.

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

Nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents :

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte :

Ma mère Affable, honorable, aimable qui représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A Mon père, pour ses efforts fournis jour et nuit pour mon éducation, ma formation et mon bien être.

A ma très chère sœur Yousra pour son hospitalité sans égal et son affection si sincère.

A mes adorables et chers frères : Saadoune, Fayçal, Nafaa et Younes pour leurs encouragements le leur compréhension.

A mes chers grand parents que Dieu les protègent.

A la mémoire de ma grande mère Louisa que son âme repose en paix.

A mon cher et exceptionnel oncle Mouhand el-Bachir et mes deux tantes Fatihia et Hayat.

A toute ma grande famille, petit et grand, sans exception.

A notre chère et dynamique enseignante assistante

AYOUNI Karima, pour tous ses efforts

Fournis qui a toujours été présente avec BOUGUELLID Ghania bien sûr.

A tous(tes) mes amis(es) dont la liste est longue surtout à mes très chères amies

Radhia, Assia et son mari Abd-elghani.

A ma chère binôme Samira ainsi que son mari Nadir.

A toute personne ayant participé dans ce travail qui était le fruit d'énormes sacrifices

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon

Affection.

Ouissam KOUACHE

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

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

A mon mari Nadir, mon âme sœur et la lumière de mon chemin qui m'a entouré par ses conseils, son soutien perpétuel et son amour généreux,

A mes chers et adorables frères : Zahir, Abedelamid, Abedelghani et Karim.

A mes sœurs: Mériama et particulièrement Fadila qui était et y est une deuxième mère pour moi, sans elle je n'aurais pas atteint ce niveau.

A ma belle-famille et surtout ma belle-mère Aicha et mon beau-frère Idir.

A mes neveux sans exception : Aissa, Rafik,

A ma nièce, petite princesse, Farah.

A mes très chères amies : Souhila, Souraya, Lamia, Kahina, Nabila et Yasmina.

A ma très chère binôme Ouissam qui m'a supportée jusqu'à la fin de l'année.

A toutes les personnes qui ont participé à ce travail et à toutes les personnes que je n'ai pas cité les noms.

Samira ZIDAT

DEDICACE

Liste des abréviations

F. angustifolia : *Fraxinus angustifolia*.

AC : Aberration chromosomique.

IM : Indice mitotique.

CP : Cyclophosphamide.

CMC : Carboxy-methyl-cellulose.

4-OH CPA : 4 Hydroxy-cyclophosphamide.

4-OOH-CPA : 4 Hydropéroxy-cyclophosphamide.

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase.

CYP450 : Cytochrome P450.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

RED: NADPH-Cytochrome P450 réductase.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

DL 50 : Dose létale 50.

UV : Ultra-violet.

G-S-T: Glutathion-s-transférase.

SEM: Somme des Ecart Moyens.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
01	La structure chimique de cyclophosphamide.	13
02	Métabolisme et voie d'activation du Cyclophosphamide.	14
03	Photographies originales de l'arbre (A), des feuilles (B) et de poudre (C) de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	18
04	Photographies originales des souris utilisées dans cette étude.	19
05	Photographies originales d'un gavage d'une souris par administration intra-gastrique(A) et d'une injection intrapéritonéale du cyclophosphamide ou de la colchicine(B).	21
06	Photographies originales de prélèvement des fémurs (A) et extraction de la moelle osseuse d'une souris (B, C).	22
07	Photographies originales de la fixation (A), coloration (B) et collage des frottis (C).	23
08	Photographie originale d'une examination sous microscope optique (X40) : cellules dans différents stades de leur division	23
09	Histogrammes comparatifs des résultats des contrôles négatifs (CMC) et positifs (CP) et le calcul de leur Indice mitotique (A) et pourcentage des cellules aberrantes sans gaps (B) et avec gaps (C).	25
10	Photographies de diverses aberrations chromosomiques observées lors du traitement avec le cyclophosphamide 1. Lacune(gap), 3. Association centromérique, 4. Pulvérisation, 5. Délétion, 6. Fragments, 7. Ring.	27
11	Histogrammes comparatifs des résultats de la génotoxicité exprimés en indices mitotiques chez les souris traitées par l'extrait de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à différentes doses.	28
12	Histogrammes comparatifs des pourcentages de cellules aberrantes des lots, mâles et femelles, traités par l'extrait de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à 125, 250, 500, et 1000 mg/kg.	29
13	Les pourcentages des cellules aberrantes des lots (mâles et femelles) traités par l'extrait de feuilles de <i>F. angustifolia</i> (250 mg/kg) et le CP (50 mg/kg), comparés aux lots témoins négatif CMC (0.8%) et témoins positif CP (50 mg/kg).	31
14	Histogrammes des résultats des pourcentages des cellules aberrantes chez les mâles et les femelles du lot traité par l'extrait de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et le cyclophosphamide (50mg/kg), comparés aux lots témoins et ceux traités par l'extrait seul à la même dose.	32

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Quelques plantes médicinales et leurs usages	03
II	Les composantes principales de <i>F. angustifolia</i> .	05
III	Les types d'intoxication	08
IV	Quelques tests de génotoxicité les plus fréquents.	16
V	Dénombrement des aberrations chromosomiques dans les métaphases « wellspread » des lots contrôles négatifs et positifs.	26
VI	Les différentes aberrations chromosomiques apparues dans les lots traités par l'extrait de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à différentes doses.	30
VII	Les différentes aberrations chromosomiques apparues dans les lots traités par l'extrait de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à différentes doses.	34

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I: Revue bibliographique

I.1. Les plantes médicinales et phytothérapie	02
I.2. Généralités sur les oléacées	03
II.3. <i>Fraxinus angustifolia</i>	03
I.3.1. Description de la plante médicinale « <i>Fraxinus angustifolia</i> »	03
I.3.2. Composition phytochimique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	04
I.3.3. Propriétés médicinales de <i>Fraxinus angustifolia</i>	05
I.4. Quelques activités biologiques des extraits et de <i>Fraxinus angustifolia</i>	06
I.4.1. Activité antimicrobienne.....	06
I.4.2. Inhibition de l'activité enzymatique d'AMPC-phosphodiesterase et de lipoxygénase.....	06
I.4.3. Activité diurétique	06
I.5. Usage et toxicité des plantes	07
I.5.1. Toxicité aigüe.....	08
I.5.2. Toxicité à court terme avec administration de doses répétées et toxicité subchronique.....	08
I.5.3. Toxicité chronique	09
I.6. Toxicité des quelques métabolites des plantes.....	09
I.7. La génotoxicité.....	10
I.7. 1. Agents mutagènes et leur mode d'action	10
I.7.1.1 Agents physiques	10

SOMMAIRE

I.7.1.2. Agents chimiques.....	11
I.8. Cyclophosphamide.....	12
I.8.1. Mécanisme d'action du cyclophosphamide	13
I.9. Les méthodes d'étude de la cytotoxicité et de la génotoxicité.....	15
I.9.1. Test d'évaluation de la cytotoxicité (MTT)	15
I.9.2. Les tests de génotoxicité	15

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes	18
II.1. Matériel.....	18
II.1.1. Matériel végétal	18
II.1.2. Matériel animal.....	19
II.1.3. Produits chimiques	19
II.1.4. Matériel et équipements de laboratoire.....	20
II.2. Méthodes	20
II.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	20
II.2.2. Test de génotoxicité et antigénotoxicité	20
II.2.2.1. Traitement des souris.....	20
II.2.2.2. Extraction et traitement de la moelle osseuse.....	21
II.2.2.3. Fixation et coloration.....	22
II.2.2.4. Examen microscopique et étude des aberrations chromosomiques	24

SOMMAIRE

Chapitre III : Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion.....	25
III.1. Résultats et interprétation.....	25
III.1.1. Résultats de l'extraction	25
III.1.2. Induction de la génotoxicité par le cyclophosphamide chez les souris	25
III.1.3. Evaluation de la génotoxicité de l'extrait de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	28
III.1.4. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur la génotoxicité induite par le cyclophosphamide	32
III.2. Discussion	35
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	42
Annexes	

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies.

Environ 65-80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**Ma et al., 1997**).

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Sanago, 2006**). L'exemple d'utilisation des extraits de plantes médicinales qui sont employées car ils contiennent des mélanges de métabolites secondaires (**Fransworth et al., 1986**), il existe plusieurs types des extraits, selon le solvant employé (eau distillée, éthanol) ainsi que la partie de végétal (feuille, écorce, fruit...) influençant le type de métabolites extraits (**Atmani et al., 2009**).

Ce travail vise à étudier une plante médicinale locale d'un grand intérêt économique, commercial et thérapeutique majeur, *Fraxinus angustifolia*, appelée couramment frêne oxyphille, de la famille des oléacées. Elle est dotée d'un pouvoir thérapeutique intéressant. (**Calis et al., 1993**).

Cette plante a plusieurs activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, antiallergique et antioxydante qui sont attribuées à ses différentes composantes actives : les coumarines, les flavonoïdes, les tanins ...etc. (**Kostova et Iossifova, 2007**), néanmoins, cela dépend de la dose utilisée de ces principes actifs qui peut provoquer une intoxication au niveau cellulaire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets génotoxiques/antigénotoxiques de l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur la toxicité induite par un agent mutagène chimique, cyclophosphamide, en utilisant un test de génotoxicité qui permet d'évaluer l'impact de ce mutagène sur le génome d'une souris.

I.1. LES PLANTES MEDICINALES ET PHYTOTHERAPIE

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme a cherché un moyen d'assouvir sa faim. Il a trouvé chez les végétaux des aliments nourrissants, mais aussi des remèdes à ses maux. Comme il a appris à différencier les plantes toxiques, Cela par des connaissances transmises d'abord oralement, puis ont été décrites et il subsiste des traces de l'emploi de ces plantes comme médicament d'où elles portent le nom de « plantes médicinales ». **(Chabrier, 2010).**

Une plante médicinale est une plante utilisée pour prévenir, soigner ou soulager les divers maux, ce sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses utilisées le plus souvent sous la forme desséchée ou à l'état frais **(Farnsworth et al., 1986).**

Le mot "phytothérapie" est d'origine grec, subdivisé en deux parties : *phuton* qui veut dire « plante » et « *therapeia* » qui signifie traitement. Elle peut donc se définir comme une discipline destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques, en utilisant soit : des plantes entières, parties actives de plantes ou des préparations à base de ces plantes ayant des propriétés thérapeutiques, qu'elles soient consommées ou utilisées par voie externe. **(Chabrier, 2010).** On distingue cinq disciplines : l'aromathérapie, la gemmothérapie, l'herboristerie, l'homéopathie et la phytothérapie pharmaceutique **(Strang, 2006).**

L'usage de ces plantes en médecine est très ancien et il revient à 3000 ans av J.C. La découverte de cette médecine a eu lieu lors de l'observation des animaux qui consomment des herbes non incluses dans leur régime alimentaire. En 1993, un anthropologue américain a observé des chimpanzés qui consomment des feuilles d'*Aspilia mossambicensis* qui révèlent les propriétés antibactériennes, antifongiques et antiparasitaires **(Farnsworth et al., 1986).**

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne **(Donath et al., 2000)**, quelques exemples sont illustrés dans le tableau I.

Tableau I: Quelques plantes médicinales et leurs usages.

Plante	Nom scientifique	L'effet thérapeutique
Menthe poivrée	<i>Mentha x piperita.. L</i>	Anesthésiant (Santoro et al., 2011) ; Scopel et al., 2014).
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	
Frêne	<i>Fraxinus excelsior</i>	Anti-inflammatoire et anti-rhumatologique (Woodhead et al., 1998 ; Garcia et al., 2011).
Prêle des champs	<i>Equisetum arvense</i>	
Géglisse	<i>Glycyrriza glabra</i>	
Galga	<i>Galga officinalis</i>	Diurétiques (Steven et al., 1997).
Genièvre	<i>Juniperus communis.L</i>	
Ail	<i>Allium sativum</i>	
Lavande	<i>Lavendula officinalis</i>	Antiseptique (Bailen et al., 2013 ; Pirbalouti et al., 2013).
Thym commun	<i>Thymus vulgaris</i>	
Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Anticancéreux (Ferreira et al., 2013 ; John et al., 2014).
If	<i>Taxus baccata</i>	

I.2.GENERALITES SUR LES OLEACEES

Environ 900 espèces dans le monde, réparties dans environ 25 genres ; 10 espèces indigènes dans la région réparties dans 5 genres ; famille des régions tropicales et tempérées, dont les représentants sont des plantes ligneuses, arbres et arbustes, rarement des lianes ; nom de la famille provenant de Olea, le nom latin de l'olivier (**Guignard, 2000**).

La famille des oléacées (oleaceae), de la division de magnoliacées (magnoliophyta), de la classe de magnoliopsida et de l'ordre des scrofulariacées (scrofulariacées), elle comporte sept arbres : le frêne, l'olivier, le troène, le phillyrea, le Jasmin, le lilas et le forsythia. Le genre Fraxinus regroupe environ 65 espèces d'arbres et d'arbustes. Les différentes espèces de frênes se rencontrent essentiellement dans les régions tempérées ou subtropicales de l'hémisphère nord (**Papanikalaou et al., 2003**).

I.3. FRAXINUS ANGUSTIFOLIA

I.3.1. DESCRIPTION DE FRAXINUS ANGUSTIFOLIA

Fraxinus venue du mot grec fraxis qui veut dire clôture, connue sous le nom de frêne oxyphylle, « dardar » en arabe et « aslène », le nom berbère. C'est une espèce autochtone, hermaphrodite et héliophile à distribution large (**Wallander, 2008**).

Fraxinus angustifolia (oléacées) a divers synonymes tels que *Fraxinus oxycarpa*, *Fraxinus pallisias*, *Fraxinus potamophila*, *Fraxinus sodgiana bung*, *Fraxinus syriaca boiss* mais *Fraxinus angustifolia* est l'appellation la plus courante.

F. angustifolia est un arbre ou arbuste qui peut atteindre une hauteur de 20 à 25m, son écorce est de couleur grise, les bourgeons sont de couleur marron, ses feuilles peuvent être regroupées sous forme d'une seule feuille et prennent une longueur entre 15 à 25cm et ses fruits sont des samares (**Djerroumi et Nacef, 2004 ; Fraxigen, 2005 ; Kostova et Iossifova, 2007 ; Beloued, 2009**).

Le frêne oxyphylle se localise dans les régions méditerranéennes, dans le sud et le centre d'Europe, l'ouest de la Russie et l'Asie, ainsi qu'au Nord-africain (l'Algérie et le Maroc), cette espèce se retrouve au bord des rivières, des bois et des habitations, sa longévité est de 150 à 200 ans (**Gerard, 2006**).

I.3.2. COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*

Plusieurs études ont identifié et rapporté des métabolites secondaires de *F.angustifolia*, quelques uns sont récapitulés dans le tableau II.

Tableau II : Les composantes principales de *F. angustifolia*.

Composantes de la plante	Exemple de composantes	Les études faites	Référence
Les flavonoïdes	Quercetin Rutin Kaempferol	.Etude phytochimique et les activités biologiques des espèces <i>Fraxinus</i> .détermination de type le plus actif pour les activités anti oxydantes, antimicrobienne et cytotoxique.	Kostova et Iossifova, 2007 Bruneton, 1999
Les coumarines	Excultin Fraxetin Scopoletin Cichorin	L'effet des coumarines sur la fonction rénales	Kostova et Iossifova, 2007
Les secoiridoïdes	Fraxicarboside A, B, C Oleuropein Ligstroside Angustifolioside Nuezhenide	Isolement des composés à partir des extraits de <i>Fraxinus</i>	Calis et al., 1993
Les phényléthnoïdes	Le verbascoside calcéolriosides	Les antioxydants de <i>F.angustifolia</i>	Calis et al., 1993 Ayouni et al., 2016
Lignanes et lignines	Pinoresinol-4'- β -D-glucopyranoside -1-hydroxypinoresino 1-4'-O- β -D-glucopiranoside	L'analyse qualitative et quantitative de la teneur en ces composés des extraits et des fractions de feuilles de <i>Fraxinus</i> .	Hosny, 1998

I.3.3. PROPRIETES MEDICINALES DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*

Cette plante est couramment utilisée en médecine traditionnelle dans différents pays du monde et dans le nord de l'Algérie spécifiquement, car elle présente plusieurs vertus thérapeutiques, les plus distingués : son effet diurétique et purgatif, pour le traitement de la constipation, démangeaison de chevelure, cystite, arthrite... etc. (**Calis et al., 1993**). Elle traite aussi de nombreuses maladies inflammatoires comme les rhumatismes et la goutte (**Beloued, 1998**). Les feuilles ont été signalées à être utilisés contre la diarrhée et les parasites intestinaux (**Ayouni et al., 2016**).

Au Maroc, *F. angustifolia* Vahl est utilisée pour de nombreuses autres fins en médecine traditionnelle pour traiter des pathologies du système digestif, en dermocosmétique et les problèmes du système nerveux (**Fakchich et Elachouri, 2014**).

I.4. QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*

I.4.1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE :

Les plantes possèdent des propriétés et des substances antimicrobiennes actives, qui les protègent contre les infections dues aux micro-organismes (virus, bactéries, champignons et protozoaires) (**Le grand, 1989 ; Saunders, 2005**).

Les extraits des feuilles du genre *Fraxinus* ont supprimé la croissance de plusieurs types de moisissures telles que : *Gloeosporum limeticola* et *Alternaria tennis*. En effet, les extraits aqueux des feuilles de *Fraxinus* ont révélé une activité antimicrobienne contre 11 micro-organismes comme ils ont constaté qu'ils montrent une forte inhibition de la croissance du *Candida albicans* (**Kostova et Iossifova, 2007**). Les extraits éthanoliques de *Fraxinus* ont révélé une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*. Des études effectuées ont montré une claire activité antibactérienne des extraits éthanoliques et des décoctions de *Fraxinus*. Contre *Bacillus subtilis* et *Leptospira ponom* (**Tshebiso et al., 2014**).

I.4.2. INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Une activité inhibitrice élevée contre l'AMPc-phosphodiesterase a été montrée par les composés fraxin et de l'isofraxidin de *Fraxinus*, Esculetine, fraxetine, le pinorésinol de lignans et pinoresinol-4- β -D-glucoside sont également actives.

L'esculetine de coumarins, l'esculetine, le scopoletin, le fraxetin et le fraxin empêchent la formation des leucotriènes de l'acide arachidonique par la lipoxygénase et améliorent les conditions allergiques (**Kostova et Iossifova, 2007**).

I.4.3. ACTIVITE DIURETIQUE

Depuis longtemps, les extraits de feuilles de *Fraxinus* ont été employés pour faciliter l'excrétion rénale. Cette activité diurétique est attribuée en présence des flavonoïdes. Les poudres sèches des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles provoquent une augmentation dépendante de la dose significative de l'excrétion des ions de sodium, de chlorure, du potassium et de l'urée et ils ont été qualifiés comme produits pharmaceutiques potentiellement utiles (**Kostova et Iossifova, 2007**).

I.5. USAGE ET TOXICITE DES PLANTES

Selon les estimations de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) (2002), plus de 80 % de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé. La toxicité des produits chimiques, le coût élevé des médicaments chimiques, l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé, surtout en milieu rural, qui limite une prise en charge véritable des problèmes de santé publique, ont favorisé le recours à cette pratique. L'Algérie ne fait pas exception et l'utilisation des plantes médicinales en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies s'est développée de manière spectaculaire.

Les cas de toxicité à cause de l'utilisation de ces plantes reconnues médicinales ne cessent pas d'augmenter. Malgré que les plantes sont faciles à utiliser, certaines d'entre elles sont d'un emploi souvent délicat et peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins néfastes, pouvant dans certains cas entraîner la mort. L'intoxication liée aux plantes se fait généralement par l'ingestion directe des plantes. Dans la majorité des cas l'individu utilise une plante qu'il croit comestible ou qu'il perçoit comme bénéfique pour sa santé. (Lapointe, 2004).

Les plantes toxiques sont des plantes qui peuvent occasionner des lésions, internes ou externes, à l'organisme humain ou animal en cas de contact ou d'ingestion d'une quantité relativement faible de graines, de racines, de feuilles, de fruits ou de sève. Le degré de toxicité d'une plante dépend de différents facteurs: il arrive que toutes les parties d'une plante ne soient pas aussi dangereuses, certaines substances toxiques peuvent être neutralisées sous l'effet de la cuisson ou du séchage ou, au contraire, mâcher ou broyer la plante peut libérer les substances toxiques (Kerharo and Adam, 1964).

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives ou quantitatives adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui ont permis d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories (Lapointe, 2004) :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas ;
- Les études expérimentales *in vivo* qui utilisent des animaux ;
- Les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules et ;
- Les études théoriques par modélisation.

On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes d'intoxications selon la fréquence et la durée d'exposition (Tableau III).

Tableau III: Les types d'intoxication.

Forme d'intoxication.	Fréquence d'administration.	Durée de l'exposition (Rongeurs).
Aiguë.	Unique.	< 24 heures.
Répétée à court terme.	Répétée.	= 1 mois.
Subchronique	Répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

On parle souvent d'intoxication subaigüe, mais ce terme est considéré comme sémantiquement incorrecte (OCDE, 1979).

I.5.1. TOXICITE AIGUE

La toxicité aigüe est habituellement définie comme l'ensemble des effets néfastes se produisant immédiatement ou peu de temps après une exposition unique ou répétée sur une période de moins de 24h à une ou plusieurs substances (Walum, 1998). Le terme toxicité orale aigüe est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité et de la DL50.

La DL50 est un terme qui a été introduit et développé par Trevan, (1927). Elle est définie comme la dose déterminée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aigüe, est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée (Oliver, 1986; Rhodes *et al.*, 1993).

I.5.2. TOXICITE A COURT TERME AVEC ADMINISTRATION DE DOSES REPETEES ET TOXICITE SUBCHRONIQUE

Alors que la toxicité aigüe concerne les effets nocifs dus à des doses uniques, une forme plus commune de l'exposition humaine à de nombreux produits chimiques se fait par la répétition de doses, qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation de produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes, et il est important d'identifier toute possibilité de ce genre par des études subchroniques.

La limite distinguant les régimes subchroniques et chroniques d'administration des doses est souvent prise comme égale à 10% de la durée de vie des animaux d'expériences. Des périodes

d'administration de doses s'étendant entre une simple dose et de 10% de la durée de vie sont souvent qualifiés de mode d'administration subaiguë. Pour distinguer des périodes décrites classiquement comme subchroniques on doit les décrire comme « étude à court terme avec administration de doses répétées ». Ceci s'applique aux études portant sur 14, 21 et 28 jours. Les durées d'études réalisées ont été principalement de 14,28 et 90 jours. D'autres durées d'études ont été utilisées en toxicologie, mais on considère que le choix de ces 3 durées principales qui ont le soutien de l'expérience ou pour lesquelles il existe des prescriptions en matière de réglementation, représente une approche raisonnable (OCDE, 1979 ; OCDE, 2008).

I.5.3. TOXICITE CHRONIQUE :

Le but d'une étude de toxicité chronique est de déterminer les effets d'une substance d'essai, chez une espèce de mammifère donnée, à la suite d'une exposition prolongée et répété (OCDE, 1979).

La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires. Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester. Il convient d'utiliser au moins 3 doses et un groupe témoins. A moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés (OCDE, 2009).

I.6. TOXICITE DES METABOLITES DES PLANTES

Généralement, les métabolites des plantes utilisés dans la thérapie sont bénéfiques et non toxiques mais, il existe certains cas où cette toxicité peut se produire à partir de ces métabolites exemple des cas de fortes doses, la façon dont la plante est utilisée ...etc. et parmi ces métabolites les coumarines, une famille de composés présents dans le genre *Fraxinus* sont rapportés pour leur toxicité.

La coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine le dicoumarol qui est typiquement présent dans le foin moisi ; chez le bétail, le dicoumarol provoque des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K qui est un facteur de coagulation du sang (Schorderet, 1992 ; Repcak *et al.*,2001).

Chez l'Homme la consommation des espèces végétales qui renferment des furanocoumarines linéaires ou angulaires provoque, s'il est accompagné d'une exposition à la lumière solaire, une dermatite phototoxique d'intensité variable allant du simple érythème jusqu'à l'apparition de bulles et de vésicules au niveau des zones exposées, quelques jours après le contact, les zones touchées présentent une hyperpigmentation (**Bruneton, 1999**). Les furanocoumarines linéaires peuvent être le support de cycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou de l'ARN, la duplication des brins est alors bloquée ainsi que la traduction des ARN. Cette propriété est souvent invoquée pour expliquer les caractères mutagènes et carcinogènes de ces molécules (**Bruneton, 1999**).

1.7. LA GENOTOXICITE

La génotoxicité se définit comme la capacité de certains agents dits « génotoxiques » à induire des dommages au niveau du matériel génétique produisant des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent générer des dommages au niveau de l'ADN ; en entraînant soit des anomalies de structure, et on parle de mutations chromosomiques, soit des anomalies de nombre, ce sont les mutations génomiques ou encore en inhibant les systèmes de réparation

Ces dommages, une fois fixés dans le génome, peuvent avoir des conséquences délétères sur la santé des organismes exposés et/ou de leur descendance : mortalité embryonnaire, malformations congénitales, infertilité, cancers, etc. (**Toyokuni et al., 1997 ; Fernandes et al., 2013**).

1.7.1. AGENTS MUTAGENES ET LEUR MODE D'ACTION

Les agents mutagènes dits génotoxiques peuvent être de nature physique, chimique ou biologique (virus tels que les rétrovirus), qui par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée induisent des modifications génétiques dans les cellules vivantes, et ils sont classés dans deux catégories :

- **Les génotoxiques directs** : modifient directement la structure de l'ADN.
- **Les progénotoxiques** : une première activation par un métabolite est nécessaire pour exercer leurs effets génotoxiques (processus de bio-activation) (**Michel, 2011**).

1.7.1.1. LES AGENTS PHYSIQUES

- Les radiations ionisantes (rayons x et gamma) sont des particules ou des ondes électromagnétiques dont l'énergie est suffisante pour arracher un électron à un atome ou à une molécule, et donne naissance à des ions et à des radicaux libres (**Naoko et Sadao, 1995**), entraînant des dommages, directs ou indirects à l'ADN, provoquant des cassures doubles brins, des lésions létales car elles touchent les fonctions vitales de la cellule (**Michel, 2011**).

- Les radiations ultraviolettes (UV), quant à elles, sont classées en trois groupes en fonction de la longueur d'onde : les UVC (190 à 280 nm), les UVB (280 à 320) et les UVA (320 à 400). Les UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques. Les UV sont fréquemment utilisés au laboratoire pour induire des mutations, particulièrement la dimérisation des bases pyrimidiques (T, C) à l'origine de lésions mutagènes voir même létales. Les conséquences les plus graves de l'exposition aux UV sont la transition de GC en AT, les mutations décalantes, les délétions et la formation des dommages oxydants (**Ding, 2008**).

1.7.1.2. AGENTS CHIMIQUES

L'utilisation des substances chimiques devient, de plus en plus, fréquentes et en développement continu. Il existe un nombre illimité de ces mutagènes qui provoquent divers conséquences souvent dangereuses sur l'environnement et la santé humaine, même à faibles doses (**El Yamani et Barrillon, 2006**). On distingue quatre groupes d'agents chimiques :

- ANALOGUES DE BASES

Il s'agit des molécules qui ressemblent par leurs structures aux bases azotées ordinaires, mais qui présentent des propriétés légèrement différentes en ce qui concerne l'appariement des bases (**Stanislav et al., 2007**). L'exemple le plus courant est celui de 5-bromouracile analogue de la thymine qui provoque la transition d'AT en GC (**Ebrahimi et al., 2013**).

- AGENT DESAMINANT OU AGENT MODIFIANT L'ADN

Ces agents donnent des mutations ponctuelles mais également des mutations plus étendues et inactivantes (**Guiraud., 1993**), son mode d'action est de modifier chimiquement les bases d'ADN (généralement au repos). Certaines sont à l'origine de l'addition de groupement alkyl ou aryl (**Winter, 2000**). L'exemple de l'acide nitreux qui agit sur l'ADN au repos, désamine l'adénine en hypoxantine, la cytosine en uracile et la guanine en xanthine et

créée des transitions d'AT en GC et probablement quelques transversions (**Kruch, 1982**).

- AGENTS INTERCALANTS

Les agents intercalants sont des molécules caractéristiques, constituées de plusieurs noyaux aromatiques accolés. Cette morphologie plane leur permet de s'insérer au cœur de la double hélice de l'ADN, entre deux plans de paires de bases successifs. La distorsion ainsi créée perturbe la progression normale des systèmes enzymatiques, inhibant de ce fait la réplication et la transcription. Ils sont également responsables de coupures mono et bi-caténares de l'ADN, suivant le type d'intercalant, ce phénomène provient de leur capacité, soit à générer des radicaux libres, soit à inhiber l'action des topoisomérases indispensable à la transcription de l'ADN (**Champoux, 2001**). L'acrédine orange proflavine, s'intercale entre les bases empilées de la double hélice de l'ADN, ce qui induit l'addition ou la délétion d'une paire de base et donc une mutation par décalage de lecture « framshift » (**Guiraud, 1993**).

- AGENTS ALKYLANTS

Ce sont des réactifs capables d'entraîner des méthylation et des ethylation aux bases azotées. Ils sont actifs sur l'ADN au repos. L'alkylation s'effectue en N ou O avec une efficacité variable selon la base, la position et le microorganisme utilisé (**Winter, 2000**). On cite comme exemple le cyclophosphamide qui est le mutagène utilisé dans cette présente étude.

1.8. CYCLOPHOSPHAMIDE

Le cyclophosphamide (CP) est un produit chimique sous forme d'une poudre blanche très fine, cristalline et sans odeur, qui est soluble dans l'eau ou l'éthanol. C'est un agent anti-néoplastique utilisé en clinique pour traiter un large éventail de cancers, y compris les tumeurs malignes tels que la leucémie, le cancer des poumons, du sein et ovarien, et comme agent immunosupresseur dans certaines maladies non-néoplastiques, avant la transplantation d'organe, mais aussi dans le traitement des troubles auto-immunes telle que la polyarthrite rhumatoïde (**Livingston et Carter, 1970 ; Lares et Penner, 1977**).

Le CP est connu sous le nom chimique 2H-1,3,2 oxazaphosphorin-2-amine,*N,N*-bis(2-chlorethyl)-tetrahydro-,2-oxide,monohydrate, de structure chimique illustrée en figure 01. Il appartient à la famille des oxazaphosphorines (**Emadi et al., 2009**).

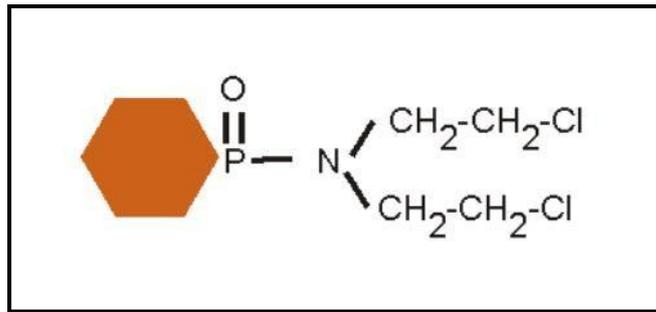


Figure 01 : La structure chimique de cyclophosphamide

I.8.1. MECANISME D'ACTION DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Le cyclophosphamide est principalement métabolisé par le CYP2B6 associée à la RED (NADPH-Cytochrome P450 réductase) en 4-OH-CP. Ce dernier est en équilibre avec son tautomère, l'aldophosphamide. Ces dérivés peuvent conduire par une β -élimination spontanée à la formation d'acroléine (sans activité anticancéreuse), et d'un dérivé moutarde : la moutarde phosphoramide (cytotoxique). Le 4-OH-CP peut être désactivé par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) en carboxyphosphamide qui n'a aucune activité anticancéreuse (**Gervot *et al.*, 1999**) (**Figure02**).

Les cytochromes P450 de la famille 2B sont les isoformes les plus impliquées dans l'activation du cyclophosphamide (CP) en métabolites cytotoxiques ayant une activité antitumorale. Chez l'Homme, il est principalement métabolisé dans le foie par le CYP2B6 en 4-hydroxy-cyclophosphamide (4-OH-CP) (**Gervot *et al.*, 1999**).

La moutarde phosphoramide est le métabolite alkylant possédant l'activité antitumorale : il génère des formes aziridium qui sont hautement électrophiles et interagissent avec l'ADN ou les protéines, tandis que l'acroléine est responsable de cystites hémorragiques. Le CP peut également être métabolisé, par une voie mineure impliquant le CYP3A4, en déchloroéthyl-CP qui est inactif et en chloroacétaldéhyde qui est responsable d'effets toxiques sur le système nerveux et l'appareil urinaire (**Niitsu *et al.*, 1998 ; Ekhart *et al.*, 2008**).

Le 4-OH-CP peut être désactivé par l'aldéhyde déshydrogénase en carboxyphosphamide qui n'a aucune activité anticancéreuse. Il a été montré sur des lignées tumorales humaines, qu'une surexpression de l'ALDH était synonyme d'une plus faible sensibilité au CP. Le 4-OH-CP est détoxifié par l'intermédiaire des Glutathion-S-Transférases (GST). (**Niitsu *et al.*, 1998 ; Ekhart *et al.*, 2008**).

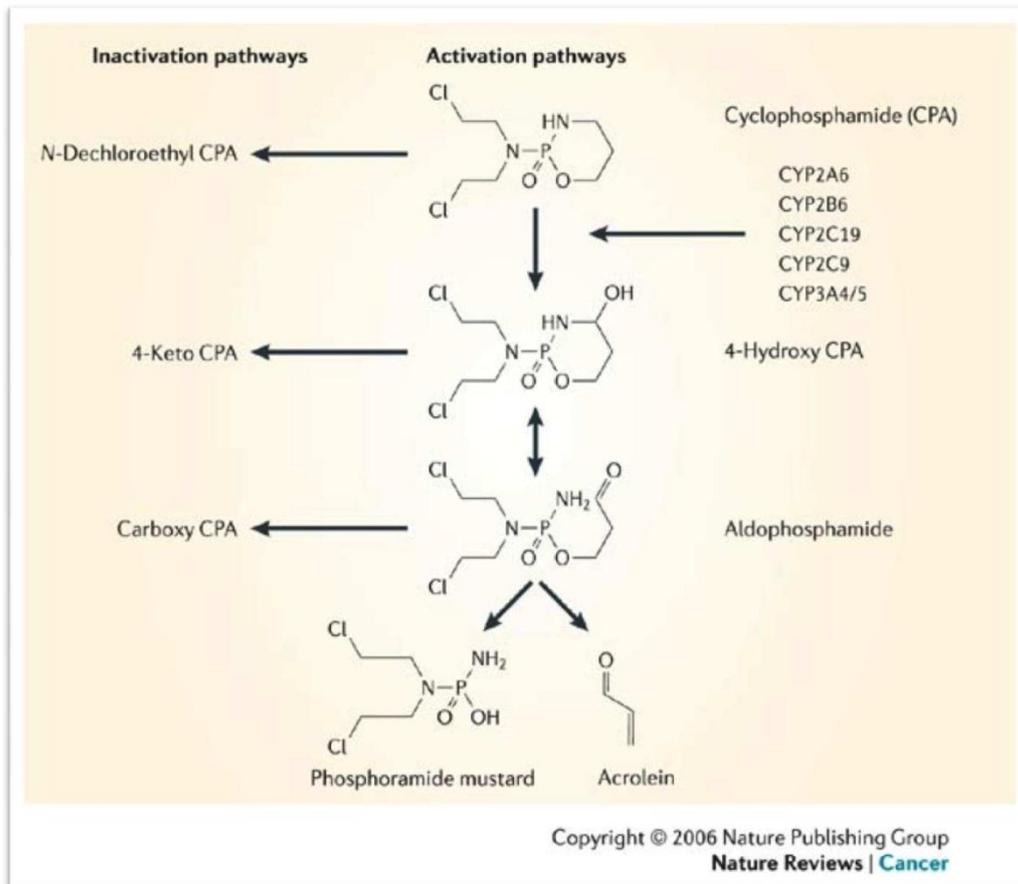


Figure 02: Métabolisme et voie d'activation du Cyclophosphamide (Stearns et al., 2006).

Les agents mutagènes peuvent induire des dommages multiples au niveau de l'ADN qui sont classés par catégories, selon le type des lésions : les lésions primaires, représentant le premier stade. Ces lésions correspondent aux adduits à l'ADN, aux pontages et/ ou cassures simples brins. Ensuite les mutations géniques telles que les additions, les délétions ou substitutions de bases induites par les composés mutagènes. La dernière catégorie rassemble les dommages aux mutations chromosomiques dites qualitatives, qui vont modifier les chromosomes dans leur structure par des cassures double brins, des réarrangements ou des translocations. Ces effets sont dits clastogènes contrairement aux effets aneugènes induisant des erreurs de répartition de chromosome entier lors des divisions (Fornace et Kohn, 1996). Afin de mettre en évidence ces différentes aberrations, une panoplie de tests de cytotoxicité et de génotoxicité ont été élaborés.

I.9. LES METHODES D'ETUDE DE LA CYTOTOXICITE ET LA GENOTOXICITE**I.9.1. TEST D'EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE (MTT)**

L'essai colorimétrique MTT détermine la capacité de cellules viables à convertir le sel tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) – bromure de 2,5-diphényltétrazolium] (MTT) soluble en précipité de formazan insoluble (**Carmichael *et al.*, 1987**). En effet, l'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit par le succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique. Le formazan est alors solubilisé et la concentration déterminée par la densité optique à 570 nm. Le résultat est un essai sensible avec un signal colorimétrique proportionnel au nombre de cellules. Grâce à ces nombreux avantages, cette méthode est considérée comme étant une avancée sur les techniques traditionnelles, car rapide, fortement reproductible avec une variation intratest réduite.

I.9.2. LES TESTS DE GENOTOXICITE :

Les tests de génotoxicité et de mutagénicité ont pour but de mettre en évidence l'induction de modifications (dommage à l'ADN, mutations, transformations cellulaire...etc.) considérées comme plus aux moins prédictives d'un potentiel mutagène et donc cancérigène (**Hartmann *et al.*, 2004**). Parmi les tests les plus utilisés sont ceux cités dans le tableau VI.

Tableau IV : Quelques tests de génotoxicité les plus utilisés.

Test	Principe	Model de cellules utilisée	Référence
Ames	Son principe repose sur l'utilisation des souches porteuses une mutation dans l'un des gènes capables de synthétiser l'histidine. Mais les bactéries auxotrophes deviennent prototrophes donc elles peuvent se croître dans un milieu minimum sans histidine ainsi ce test consiste à compter le nombre de colonies ayant poussées sans histidine suite à l'incubation avec des agents mutagènes	Souches de <i>Salmonella typhinurium</i>	Mortelmans et Zeiger, 2000
Comète	Cette technique consiste à suspendre des cellules dans un gel d'agarose sur une lame de microscope, puis après une lyse cellulaire et la libération des noyaux, ces derniers vont migrer dans un champ électrophorétique puis révèlé par l'addition d'un intercalant fluorescent :bromure d'ethydidium , si l'ADN n'a pas été endommagé (reste sous forme super enroulée)sera révèlé sous forme d'une sphère compacte.et s'il a été endommagé, celui-ci présentera en plus des fragments simples et doubles brin qui migreront en dehors de cette sphère.	Appliqué à de nombreux types cellulaires	Collins, 2004
Micronoyau	Le principe du test des micronoyaux consiste à mettre en évidence des anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure par la détermination et le dénombrement, au sein d'une population cellulaire en interphase, des cellules présentant une ou plusieurs entités nucléaires indépendantes du noyau principal.	Appliqué à toutes types de cellules eucaryotes binucléées (cellules vésicales, endobuccales, fibroblastes, lymphocytes T...etc.).	Botta, 2002
SOS Chromotest	SOS Chromotest est une méthode quantitative, basée sur la mesure de deux activités enzymatiques (β -galactosidase et phosphatase alcaline) dans un milieu liquide. C'est un test colorimétrique qui mesure l'expression des gènes induits par des agents génotoxiques chez <i>Escherichia coli</i> , au moyen d'une fusion avec le gène structural de la β -galactosidase. Ce test est un test simple, efficace et rapide de génotoxicité.	Souche bactérienne <i>E. coli</i> .	Khallef <i>et al.</i> , 2014

Dans cette étude, l'évaluation de la génotoxicité de l'extrait éthanolique de feuilles de *F.angustifolia*, sera effectué par le test des aberrations chromosomiques.

Ce dernier est essentiellement basé sur l'évaluation *in vivo* du risque d'apparition des aberrations chromosomiques dues à la présence d'un mutagène ainsi que son identification. Comme il peut également s'appliquer *in vitro* sur des cultures de lignées cellulaires. Il s'applique généralement sur la moelle osseuse (un tissu très vascularisé et facile à prélever). Des rongeurs (souris) traités avec la colchicine (inhibiteur du fuseau) avant leur sacrifice. Les cellules en métaphase sont examinées sous microscope optique après une coloration afin d'isoler et d'identifier les différentes aberrations chromosomiques (OCDE, 2014).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL VEGETAL

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* (Oleaceae)(**Figure 03**) ont été récoltées en juillet 2015 de la province de Chemini. Cette localité est à 963 m d'altitude, 36°35' de latitude et 4°36' de longitude de la forêt d'Akfdou, à 70 Km à l'ouest de la wilaya de Bejaïa. Les échantillons ont été séchés à l'air libre en fin de juillet et mois d'aout dans un endroit ombragé à température ambiante. Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (KIKA Labortechnik, Staufen, Allemagne), puis tamisées et réduites ainsi en une fine poudre de 63 µm comme décrit dans **Ayouni et al. (2016)**.

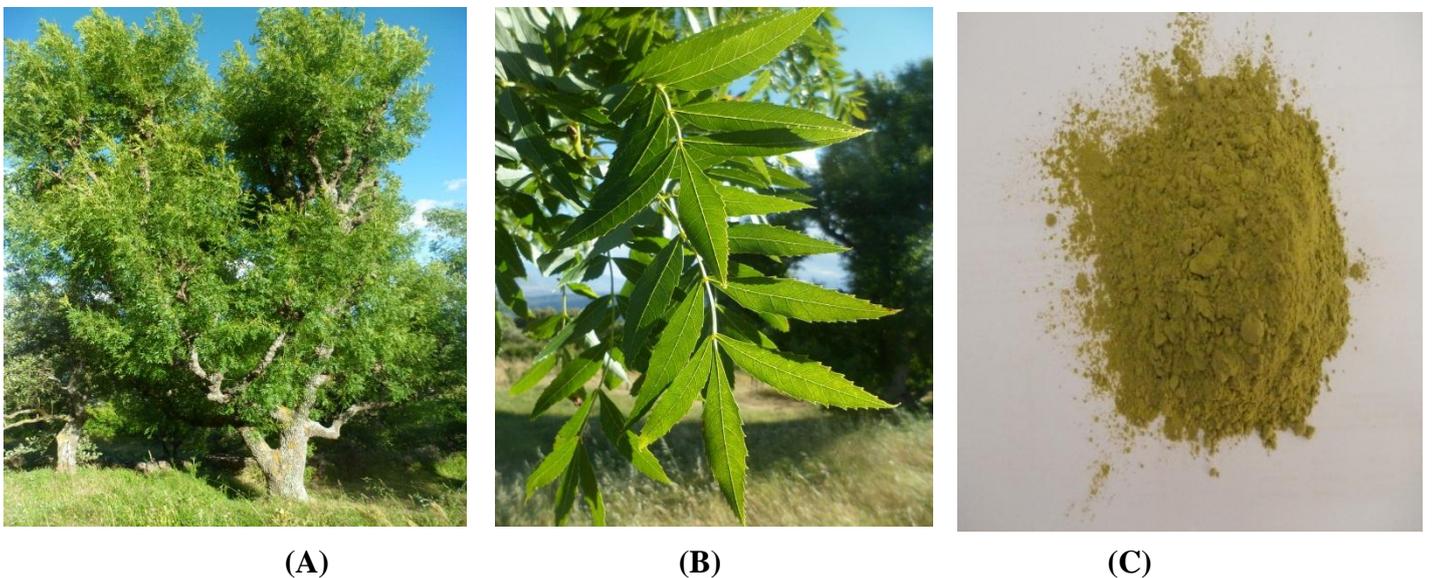


Figure 03 : Photographies originales de l'arbre (A), des feuilles (B) et de poudre (C) de *Fraxinus angustifolia*.

Selon **Wallander (2008)**, la classification de *Fraxinus angustifolia* est comme suit :

Règne : plantae

Division : magnoliophyta

Classe : magnoliopsida

Famille : oléaceae

Genre : *Fraxinus*

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

II.2. MATÉRIEL ANIMAL

Les expériences ont été réalisées sur des souris albinos mâles et femelles de type NMRI (*mus musculus domesticus*) (**Figure 04**), les souris sélectionnées sont âgées de 6 à 8 semaines (28g à 37g) fournis par l'Institut Pasteur d'Alger (Kouba). Elles ont été réparties en 14 groupes de 6 souris par cage, et maintenues à $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ grâce à un climatiseur, avec un cycle de lumière et d'obscurité 12h/12h. Elles reçoivent de la nourriture de bétail à base de maïs et de soja fournis par l'ONAB d'Elkseur, Bejaia, et de l'eau potable de façon continue.

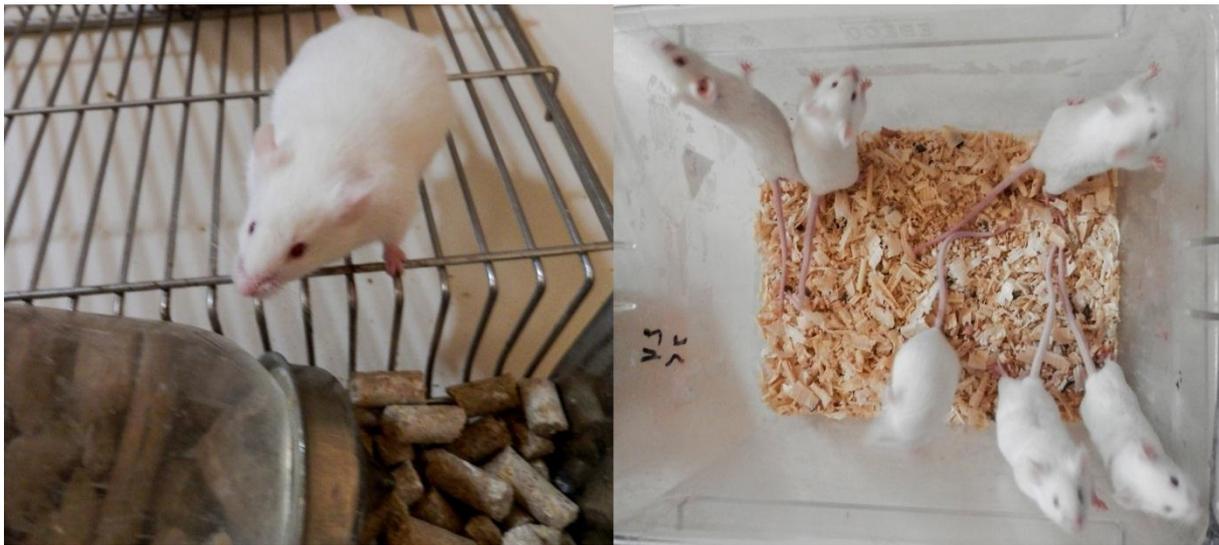


Figure 04: Photographies originales des souris utilisées dans cette étude

II.3. PRODUITS CHIMIQUES

- Carboxy-méthyl-cellulose (CMC) (Sigma-Aldrich),
- Cyclophosphamide(CPM, Sigma aldrich),
- Colchicine (Biochem Chemopharma),
- Chlorure de potassium(KCl, PANREAC),
- Le fixateur (1v Acide acétique de Sigma Aldrich + 3v Méthanol de Biochem Chemopharma,
- Ethanol de PROLABO (C₂H₆O),
- Giemsa : sulfate de magnésium(MgSO₄)(Societe Chimique Pointet GIRARD), l'euro kit,
- Xylène (Sigma aldrich, Etats-Unis),
- Huile à émersion(ZEISS),
- Chloroforme de Biochem Chemopharma.

II.4. MATERIEL ET EQUIPEMENTS DE LABORATOIRE

Microscope optique (ZEISS) à grossissement (X10, X40, X100), agitateur (VELP), l'étuve (ECOCLL), sonicateur (RAYPA), centrifugeuse (SIGMA), lyophilisateur (Creast Model Alpha), rota-vapeur (HEIDOLF, Germany), balance de précision (RADWAG), bain marie (MEMMERT).

Les ballons, Lames et lamelles, tubes à essai, micropipettes, erlenmeyer, éprouvettes, béchers, pipettes, barreaux magnétiques, spatules, pinces, ciseaux de dissection animale, seringues.

II.5. PROCEDURE EXPERIMENTALE

II.5.1. PREPARATION DE L'EXTRAIT DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*

La poudre fine de feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été macérée dans l'éthanol (96%) avec un rapport de 4 volumes d'éthanol pour 1 gramme de poudre, sous agitation pendant 24 heures. Après laisser le mélange décanter pour une durée de 12 heures, le surnageant a été récupéré et centrifugé (1500g/10 min) pour se débarrasser de toute trace de poudre, cette étape a été répétée avec un nouveau volume d'éthanol. Les surnageant récupérés ont été homogénéisés puis séchés à l'aide d'un rotavapeur afin de récupérer l'extrait éthanolique sec, qui a été pesé jusqu'à stabilisation de son poids. L'objectif de cette extraction est d'épuiser le maximum de composés contenus dans la poudre de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

II.5.2. TEST DE GENOTOXICITE ET ANTIGENOTOXICITE

II.5.2.1. TRAITEMENT DES SOURIS

L'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été dissous dans du CMC (0.8%) afin de préparer 4 concentrations croissantes 125, 250, 500 et 1000 mg/kg qui ont été administrées par gavage (**Figure 05 A**) aux souris dans des volumes relatifs à leur poids corporel pendant 7 jours consécutifs (tout en vérifiant les différents changements qui apparaissent sur les souris tels que le poids, le comportement...etc.). Le cyclophosphamide (50mg/10ml/kg) a été préparé dans l'eau distillée stérile pour être injecté par voie intrapéritonéale (**Figure 05 B**), 1h après le dernier gavage de l'extrait.

- Deux groupes (mâles et femelles) témoins négatifs ont reçu uniquement la solution véhicule (CMC 0.8%) par gavage pendant les 7 jours.

- Deux groupes (mâles, femelles) témoins positifs ont reçu du CMC (0.8%) 7 jours consécutifs, puis une injection de cyclophosphamide, 1h après le dernier gavage.
- 04 lots mâles et 04 autres lots femelles ont reçu les différentes concentrations de l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia* (125, 250, 500 et 1000 mg/kg), respectivement, pour le test de génotoxicité.
- Deux groupes (mâles, femelles) ont été réservés pour le test d'antigénotoxicité dont les souris ont été traitées par l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* à une concentration de 250mg/kg pendant 7 jours, ainsi elles ont été injectées par le cyclophosphamide 1h après le dernier gavage.

Tous les groupes de souris (14 lots) ont été injectés par la colchicine (4mg/kg) dans le but d'arrêter la division cellulaire, 2h avant leur sacrifice par dislocation cervicale.



A

B

Figure 05: Photographies originales d'un gavage d'une souris par administration intragastrique (A) et d'une injection intrapéritonéale du cyclophosphamide ou de la colchicine (B).

II.5.2.2.EXTRACTION ET TRAITEMENT DE LA MOELLE OSSEUSE

Après leur sacrifice, les souris ont été rapidement disséquées (**Figure 06A**) afin de récupérer les deux fémurs (**Figure 06B**) de chaque souris. Ensuite, la moelle osseuse a été rapidement extraite dans des tubes contenant de KCl préincubés à 37°C pour maintenir la même température de la souris (**Figure 06C**). Les tubes ont été remis à l'étuve pour une incubation de 30 min, suivie de la première centrifugation (1500 tour/10min).

Les surnageants ont été débarrassés et les culots ont été récupérés et resuspendus dans un petit volume de KCl. 5 ml de fixateur de Cornoy ont été ajoutés goutte à goutte avec une agitation manuelle. Les tubes ont été ensuite recentrifugés pendant 10min, puis les surnageants ont été jetés et les culots ont été resuspendus dans 2 ml de fixateur renouvelé. Les échantillons ont été stockés à 4°C pendant 12H.

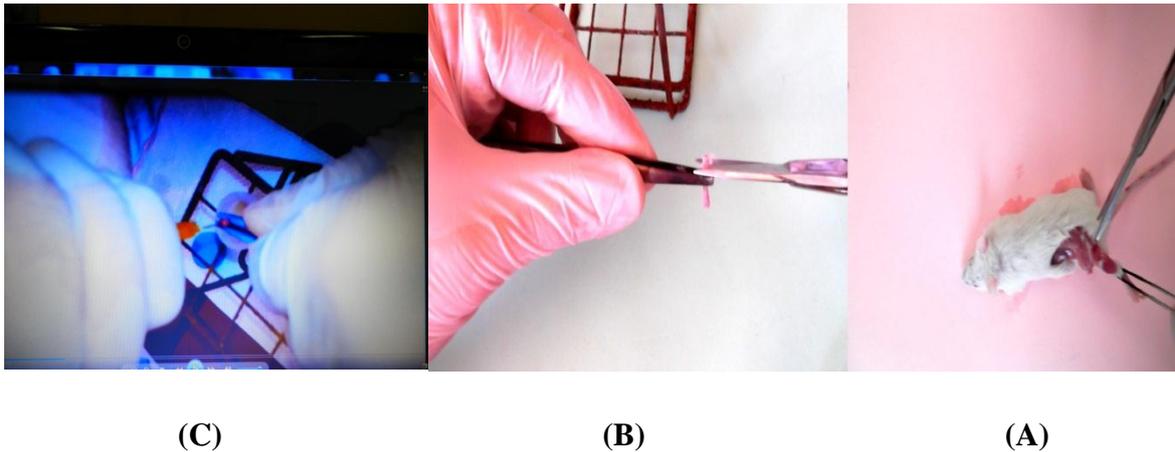
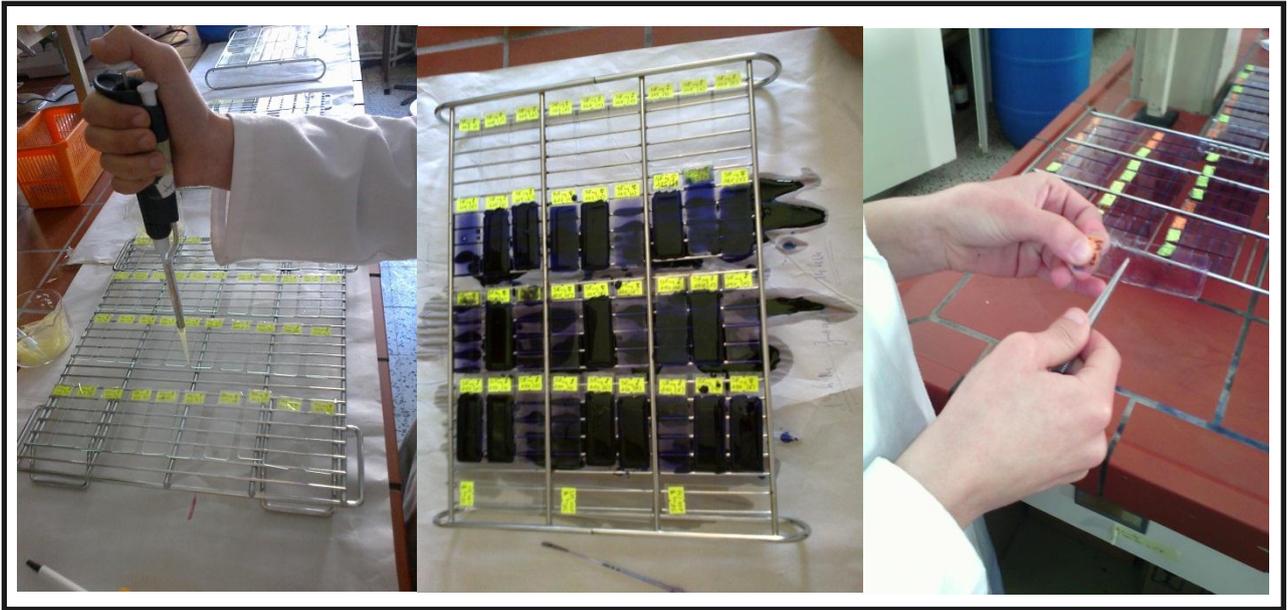


Figure 06 : Photographies originales de prélèvement des fémurs (A) et extraction de la moelle osseuse d'une souris (B,C).

II.5.2.3. FIXATION ET COLORATION

Deux autres centrifugations et renouvellement de la solution fixatrice ont été réalisés, avant de resuspendre le dernier culot obtenu dans un volume minimal de fixateur. Les suspensions obtenues ont été étalées sur des lames soigneusement nettoyées et étiquetées et laisser séchées pendant une heure (**Figure 07A**). Enfin, les frottis obtenus ont été colorés par le GIEMSA aqueux (10%) pendant 20 à 30 min (**Figure 07B**), suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée. Une lamelle a été tracée par des lignes de l'eurokit qui a été plongée ensuite dans une solution de Xylène et collée sur le frottis tout en éliminant les traces des bulles d'air et l'excès de colle (**Figure 07C**). Les lames sont ainsi prêtes pour l'observation et l'analyse microscopique (**Figure 09**).



(A)

(B)

(C)

Figure 07 : Photographies originales de la fixation (A), coloration (B) et collage des frottis (C)

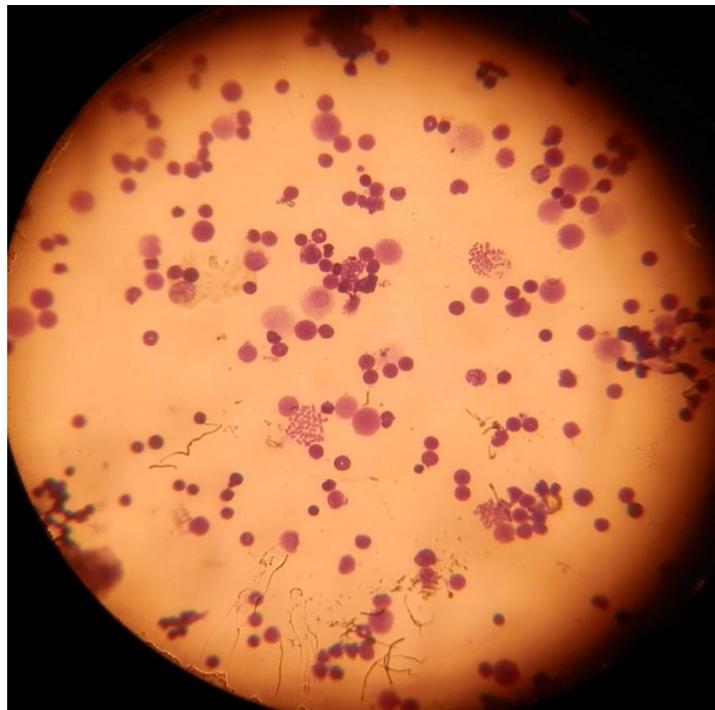


Figure 08 : Photographie originale d'une examination sous microscope optique (x40) : cellules dans différents stades de leur division.

II.5.2.4. EXAMINATION MICROSCOPIQUE ET ETUDE DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

L'analyse microscopique inclue le dénombrement des cellules en différents stades de leur division cellulaire que ce soit des cellules en division ou les interphases dans le but de calculer l'indice mitotique pour chaque souris (2 lames) examinée et qui a été obtenue selon **Mazumdar et al., (2011)** par la formule suivante :

$$\text{L'indice mitotique (IM\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules en division}}{\text{Nombre de cellules dénombrées}} * 100$$

L'analyse de 100 métaphases où les chromosomes de la cellule sont bien dispersés et étalés, ce qu'on appelle « Well spread metaphasis » a été réalisée pour chaque souris afin de repérer les différents types d'aberrations chromosomiques et les dénombrer, ceci en balayant toutes les lames.

Dans ce test, il est généralement recommandé de prendre en considération, les différentes aberrations chromosomiques tel que lacunes « Gaps », les anneaux « Rings », les fragments, les pulvérisations, et les polyploïdies, ainsi que le pourcentage des cellules aberrantes qui a été calculé suivant la méthode de **Mazumdar et al., (2011)** comme suit :

$$\text{Le taux des cellules aberrantes} = \frac{\text{Nombre de cellules aberrantes}}{\text{Somme des cellules dénombrées}} * 100$$

Remarque : une cellule aberrante peut présenter plus d'une seule aberration

II.6. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Les résultats ont été exprimés en moyenne plus ou moins SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel statistique Graph Pad Prism de l'analyse de la variance ANOVA one way, la différence entre les témoins et les différents tests a été obtenue par les post-tests de comparaison multiples Dunnett et Tukey. Les valeurs sont considérées statistiquement significative à *P<0.05 vs le lot contrôle négatif et #P<0.05 vs le lot contrôle positif.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III.1.1. RESULTAT DE L'EXTRACTION

L'objectif de l'extraction éthanolique est d'obtenir un maximum de composés, particulièrement phénoliques, le rendement en extrait éthanolique sec de feuilles de *F.angustifolia* est d'environ 19%. Ce rendement est considéré relativement élevé.

III.1.2. INDUCTION DE LA GENOTOXICITE PAR LE CYCLOPHOSPHAMIDE

L'effet induit par le cyclophosphamide sur les souris mâles et femelles, en comparant les pourcentages des indices mitotiques entre les groupes des contrôles négatifs (CMC : Carboxy Methyl Cellulose à 0.8%) et positifs (CP : Cyclophosphamide à 50 mg/kg), est illustré dans la figure 09 :

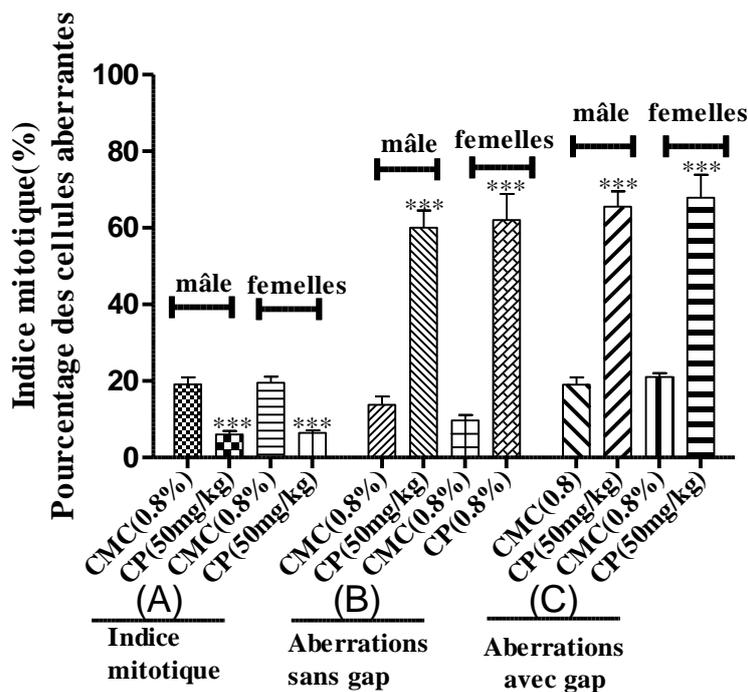


Figure 09: Histogrammes comparatifs des résultats des contrôles négatifs (CMC) et positifs (CP) et le calcul de leur indice mitotique (A) et pourcentage des cellules aberrantes sans gaps (B) et avec gaps (C).

Les résultats de l'analyse statistique comparative entre le lot contrôle négatif et le lot contrôle positif sont hautement significatifs (***) $p < 0.01$, c'est-à-dire que l'indice mitotique des lots traités par le cyclophosphamide (50 mg/kg) est très réduit comparativement au lot

contrôle négatif (CMC 0.8%), ce qui signifie que le cyclophosphamide a exercé un effet sur la division cellulaire et, par conséquent, sur l'IM. En effet, il a été remarqué, lors des observations microscopiques, que les cellules en division ont été plus abondantes chez les souris traitées seulement par le CMC (0.8%) que chez les souris traitées par le CP (50 mg/kg).

De même pour calcul des pourcentages des cellules aberrantes (**B, C**) où les résultats de l'analyse statistique entre le pourcentage des cellules aberrantes (sans et avec gaps) chez les souris traitées par le cyclophosphamide est très hautement significatif (**P<0.01) par rapport au pourcentage des cellules aberrantes chez les souris traitées uniquement par le CMC (0.8%). Cela suggère que le CP a augmenté l'apparition des cellules contenant des aberrations chromosomiques. Les mêmes observations ont été retenues pour les lots de souris mâles et femelles ayant reçu les mêmes traitements.

Les différents types d'aberrations chromosomiques détectées et dénombrées chez les deux lots contrôles négatifs et contrôles positifs, mâles et femelles, sont illustrées dans le tableau ci-après :

Tableau V: Dénombrement des aberrations chromosomiques dans les métaphases « wellspread » des lots contrôles négatifs et positifs.

Met.spread Number	Différentes aberrations chromosomiques							
	(Gap)	anneau Ring	Fragment	Del.chrom	Ass.cent	Pulvérisation	Polypléidie	
♀ CMC	50	5	1	1	1	2	0	1
	50	9	1	3	1	0	0	0
	100	12	3	1	1	2	0	0
♂ CMC	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
	100	4	2	10	1	3	0	0
♀ CP	100	18	0	36	29	6	1	0
	100	9	4	48	10	18	6	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
♂ CP	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
	64	8	10	17	8	2	32	0

D'après les résultats du **tableau V**, les aberrations apparues chez les souris des contrôles de CMC (0.8%) sont : les lacunes (gaps), quelques fragments et délétions chromosomiques à de faibles taux, comparativement aux aberrations chromosomiques

observées chez les lots traités par le cyclophosphamide. Dans ce dernier une forte incidence d'aberrations chromosomiques a été observée. Parmi ces aberrations, les fragments et les pulvérisations, ont été les majoritaires (22-78 pulvérisations et 10-48 fragments). De plus, quelques lacunes (gaps), associations centromériques et anneaux (rings) ont été observées. Ce qui confirme une fois de plus, l'effet mutagène du CP, qui favorise les cassures du matériel génétique, d'où la fréquence des fragments et des pulvérisations. Cependant les aberrations chromosomiques, étaient peu répandues, voir négligeables dans le contrôle négatif, ceci aussi bien chez les mâles que les femelles.

Ces différentes aberrations sont illustrées par les photographies des figures suivantes :

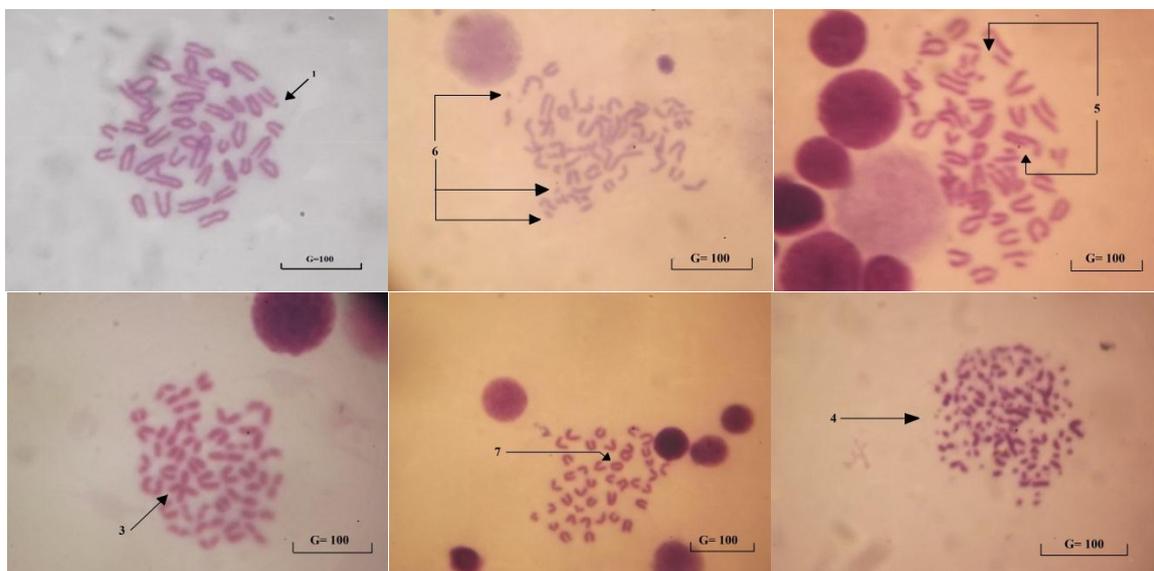


Figure 10 : Photographies de diverses aberrations chromosomiques observées lors du traitement avec le cyclophosphamide. **1.** Lacune (gap), **3.** Association centromérique, **4.** Pulvérisation, **5.** Délétion, **6.** Fragments, **7.** Anneau (ring).

III.1.3. EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE L'EXTRAIT DE FEUILLES DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*

La génotoxicité de l'extrait éthanolique des feuilles de *F.angustifolia* a été évaluée en fonction de la dose administrée (125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg et 1000 mg/kg). Les résultats des indices mitotiques obtenues, chez les mâles et les femelles, sont représentés dans les histogrammes de la figure 11.

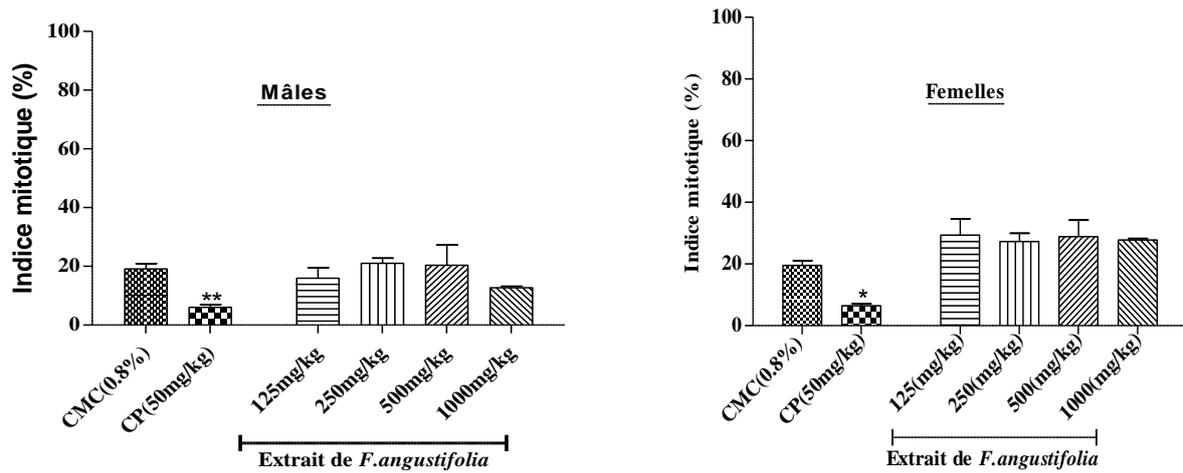


Figure 11 : Histogrammes comparatifs des résultats de la génotoxicité exprimés en indices mitotiques chez les souris traitées par l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* à différentes doses.

Les deux figures ci-dessus représentent l'analyse statistique de l'indice mitotique calculé pour des lots de souris mâles et femelles comparés entre des lots témoins (CMC et CP) et les lots traités par l'extrait des feuilles de *F. angustifolia*. Elles montrent qu'il n'existe aucune différence significative ($p < 0.05$) entre le témoin négatif (CMC 0,8%) et les différentes doses de l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* (125mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg et 1000mg/kg), cela s'explique que cet extrait n'a pas montré de signes de cytotoxicité à toutes les concentrations testées.

Par contre, la comparaison des indices mitotiques des lots traités par les doses d'extrait à celui traité par le cyclophosphamide est très significatif ($p < 0.05$), ce qui confirme que les extraits n'ont pas réduit l'indice mitotique, donc n'ont pas affecté la division cellulaire.

Les pourcentages des cellules aberrantes (avec et sans gaps) calculés pour les lots traités par ces différentes doses de l'extrait de feuilles de *F. angustifolia*, sont représentés dans les histogrammes de la figure 12.

D'après l'histogramme obtenu par l'analyse statistique, les pourcentages des cellules aberrantes de CMC, CP et de l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* aux différentes doses testées n'ont montré aucune différence significative avec le lot témoin négatif, ce qui est en cohérence avec les résultats des calculs des indices mitotiques respectifs. En effet, ces pourcentages de cellules aberrantes sont très hautement inférieures ($***P < 0.01$) à ceux du lot témoin positif (le CP), que ce soit avec ou sans gaps, cela veut dire que le mutagène utilisé a induit un pourcentage élevé d'aberrations chromosomiques qui est très significative

contrairement à l'extrait, ceci prouve que l'extrait éthanolique de feuilles de *F.angustifolia* n'a pas exercé d'effet génotoxique apparent sur les cellules de souris.

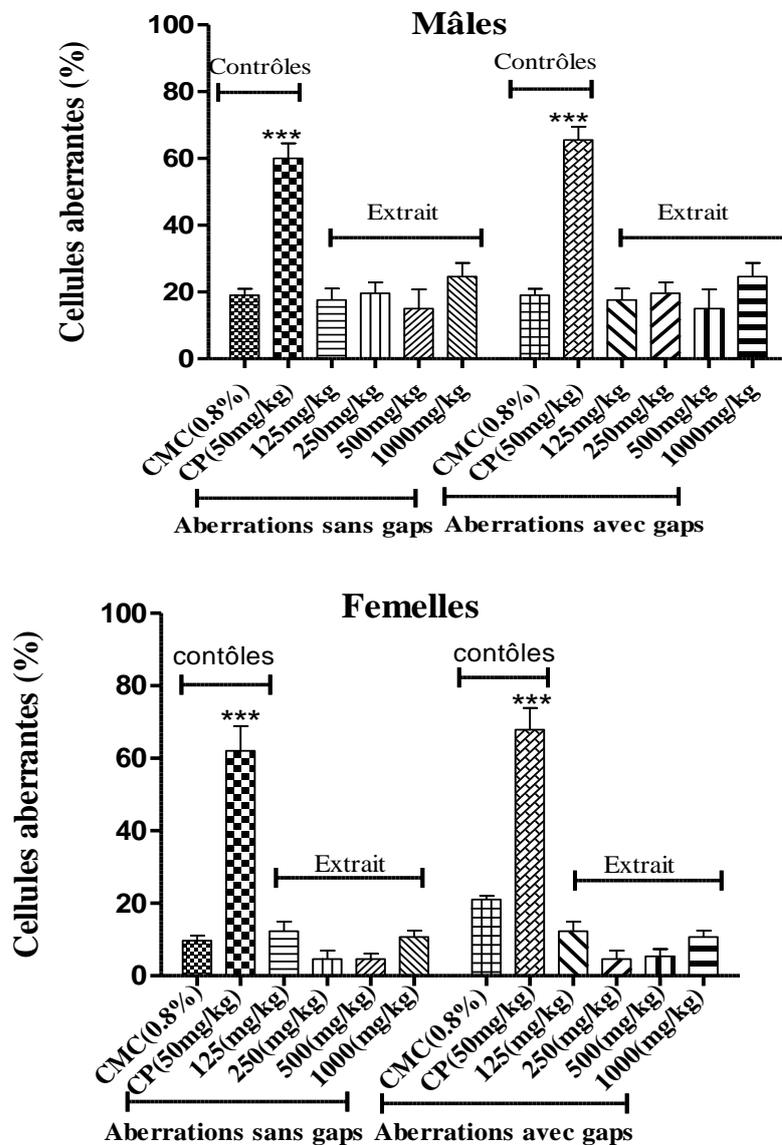


Figure 12 : Histogrammes comparatifs des pourcentages de cellules aberrantes des lots, mâles et femelles, traités par l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* à 125, 250, 500, et 1000 mg/kg.

Les aberrations détectées et dénombrées sont détectées dans le tableau VI. Ce dernier montre clairement que les différentes aberrations existantes chez les souris traitées par les diverses concentrations de l'extrait sont presque similaires à celles détectées chez le lot de CMC (0.8%), ce qui peut signifier que cet extrait n'a pas eu d'effet génotoxique sur les souris, que ce soit mâles ou femelles.

Parmi ces aberrations, les plus répandues, ce sont les associations centromériques qui ont été différentes entre mâles et femelles. Elles seraient dues à des confusions entre superpositions des chromosomes qui ont été considérées comme association centromériques par un observateur et pas par un autre.

L'apparition de quelques polyplœidies dans ces lots traités par l'extrait a été remarquée. Celles-ci n'ont pas été détectées chez les souris des lots contrôles. Cela pourrait être lié à des interactions des substances contenues dans l'extrait avec les facteurs de division cytoplasmique, malgré la duplication du matériel génétique (chromosomes).

III.1.4. EVALUATION DE L'EFFET PREVENTIF DE L'EXTRAIT DE FEUILLES DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA* SUR LA GENOTOXICITE INDUITE PAR LE CYCLOPHOSPHAMIDE

Les histogrammes de la figure 14 rapportent l'évaluation de l'effet préventif de l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* à 250mg/kg contre la toxicité induite par le CP (50mg/kg), tenant en compte les résultats obtenus des calculs des indices mitotiques, des pourcentages des cellules aberrantes et le dénombrement des différentes aberrations chromosomiques.

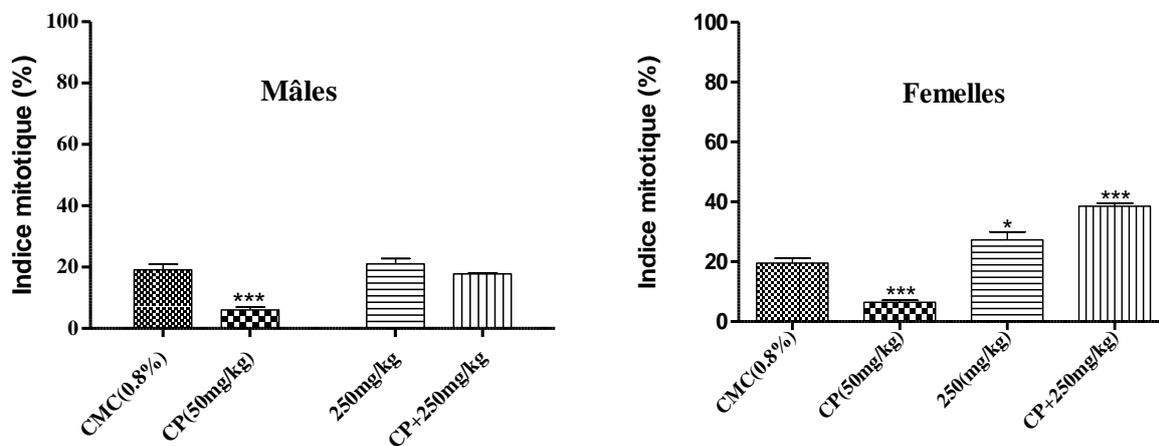


Figure 13 : Les pourcentages des cellules aberrantes des lots (mâles et femelles) traités par l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* (250 mg/kg) et le CP (50 mg/kg), comparés aux lots témoins négatif CMC (0.8%) et témoins positif CP (50 mg/kg).

Concernant les lots des mâles, lors du traitement des souris par l'extrait des feuilles de *F.angustifolia* par la concentration de 250 mg/kg combiné au cyclophosphamide, les résultats statistiques de l'IM sont non significatifs ($p < 0.05$), comparativement au lot témoin négatif

(CMC 0.8%) et celui traité seulement par l'extrait (250mg/kg). Cependant, le lot traité avec du CP+250mg/kg a montré une augmentation significative de l'indice mitotique comparativement au lot traité avec le CP seul. On déduit que le CP n'a pas pu influencer sur la division cellulaire chez les souris en présence de l'extrait. Ce qui suggère que l'extrait a montré un effet cytoprotecteur, voir anti-génotoxique vis-à-vis du mutagène CP.

Cependant le lot des souris femelles, d'après leur analyse statistique de l'IM de l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* combiné au CP est hautement significative (**P<0.001) par rapport au témoin négatif, ce qui indique que la division cellulaire chez ce lot de souris a été rétablie voir même accélérée comparativement à l'état normal. Cela veut dire que la division cellulaire a été accompagnée par une induction des systèmes de réparation des aberrations chromosomiques, qui étaient engendrées par le CP, indiquant ainsi un effet anti-cytotoxique et anti-génotoxique.

La figure 14 illustre les pourcentages des cellules aberrantes lors du traitement des souris (mâles et femelles) avec seulement de CMC (0.8%), comparativement au traitement combiné de l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* à une dose de 250 mg/kg avec le CP (50 mg/kg), qui ont permis de mettre en évidence l'effet anti-génotoxique de cette extrait vis-à-vis du mutagène, notamment chez les femelles.

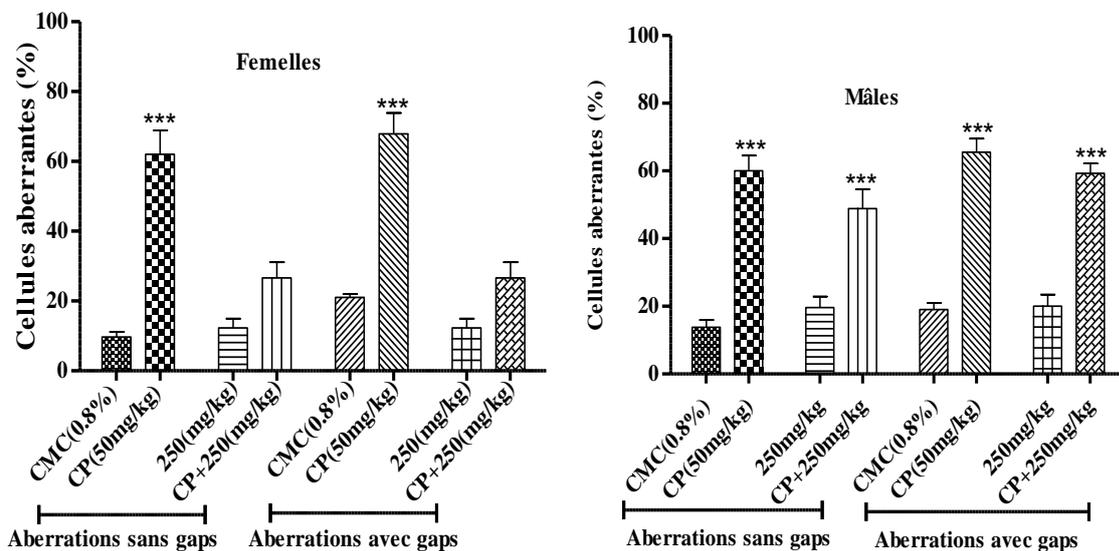


Figure 14 : Histogrammes des résultats des pourcentages des cellules aberrantes chez les mâles et les femelles du lot traité par l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* et le cyclophosphamide (50 mg/kg), comparés aux lots témoins et ceux traités par l'extrait seul à la même dose.

En effet, la combinaison d'extrait éthanolique de feuilles de *F. angustifolia* a été significatif par rapport au lot de CP, ce qui peut expliquer que l'extrait de feuilles a pu corriger le taux d'aberrations induites par le cyclophosphamide, cela est en concordance avec la diminution du pourcentage des aberrations chromosomiques, particulièrement chez les lots de femelles, c'est-à-dire que l'extrait de *F. angustifolia* a eu un effet anti-génotoxique à la dose 250 mg/kg utilisé avec le CP et même lorsqu'il était utilisé seul, car on remarque d'après l'histogramme que son pourcentage est plus élevé que celui du CMC. De même pour l'état sans gaps, parce-que y a pas eu d'induction de gaps, ce qui est montré dans le tableau **VII**, qui montre les différentes aberrations chromosomiques induites au cour du traitement des souris avec le cyclophosphamide combiné à l'extrait de feuilles de *F. angustifolia*.

Le tableau VII montre que les différentes aberrations provoquées par le cyclophosphamide et qu'on a observé chez ce lots ont été diminuées en terme de quantité dans le lot à la concentration de 250 mg/kg, ce qui peut être dû à l'effet probable de l'extrait de feuilles qui a peut être corrigé l'effet mutagène ou génotoxique du CP. D'où on a eu presque les mêmes chez le lot du CMC (0.8%) et cela concerne les souris mâles, cependant les femelle qui a eu ce même résultat mais encore plus élevé ce qui peut être dû à la suppression des aberrations même spontanées.

Concernant les souris traitées par combinaison de CP (50 mg/kg) et l'extrait à 250mg/kg, que ce soit mâles ou femelles, les résultats d'aberrations étaient considérables concernant les pulvérisations et les fragments mais pas autant comme celui traité que avec le cyclophosphamide car l'extrait a pu diminuer le taux de ces aberrations qui ont été dûes peut être au CP, d'où l'extrait a eu probablement un effet antigénotoxique dû à ses métabolites secondaires.

III.2. DISCUSSION

L'objectif de ce travail est l'étude de la toxicité induite par un agent mutagène chimique qui est le cyclophosphamide, en utilisant le test de génotoxicité qui nous a permis d'évaluer l'impact de ce mutagène sur le génome de souris, suivi par l'évaluation des effets génotoxique et antigénotoxique de l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Cette dernière, comme de nombreuses plantes, est utilisée dans la médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques surtout pour traiter l'arthrite et les rhumatismes. De plus pour ses activités biologiques intéressantes telle que l'activité anti-inflammatoire, antiproliférative, antimicrobienne, et notamment l'activité antioxydante (**Kostova et Iossifova, 2007**).

Ces plusieurs activités ont été attribuées principalement à ses métabolites secondaires majoritairement, les sécoiridoïdes dans les feuilles, les phényléthanoides dans les écorces et les flavonoïdes dans les deux parties végétales, principalement la rutine, quercétine glycosylée et des dérivés de Kaempférol (**Ayouni et al., 2016**). C'est pour cela, dans cette étude, l'extraction a été réalisée par l'éthanol, considéré comme le solvant le plus approprié pour obtenir cette gamme de composés phénoliques. Suite à des études comparatives faites pour des différents extraits issus de plantes, où l'extrait éthanolique a montré un meilleur rendement, qui est dans cette étude de 19%, un résultat similaire à celui rapporté par **Adjibimey et al. (2004)**. Ce rendement relativement élevé peut être lié à la nature de la matrice végétale. En effet, l'extraction peut être influencée par plusieurs paramètres physico-chimiques rapportés par **Atmani et al., (2009)** et **Ayouni et., (2016)**, tels que le type du solvant utilisé, les méthodes de cueillette, séchage et extraction,... etc.

Dans cette étude, l'évaluation de la génotoxicité des feuilles de *Fraxinus angustifolia* qui a été réalisé par la méthode des aberrations chromosomiques, c'est une méthode basée essentiellement sur l'évaluation *in vivo* du risque d'apparition des aberrations chromosomiques, dues à la présence d'un mutagène, cette méthode permet d'isoler et d'identifier les aberrations provoquées au cours de la mitose sous une examination microscopique. Cette technique est sensible vis-à-vis l'agent mutagène utilisé et déterminer son impact sur les cellules de la moelle osseuse de souris (**OCDE, 2014**). Cette méthode présente l'avantage de s'appliquer aux organismes eucaryotes et mammifères. En effet les rongeurs présentent des similarités métaboliques avec l'être humain, ceci est en faveur d'une extrapolation des résultats obtenus. De plus, l'administration orale des traitements par les

extraits de *F. angustifolia*, permet à l'extrait de passer par un métabolisme ayant pour avantage de déterminer les effets de ses métabolites, mais aussi de probables effets de ses dérivés métaboliques issus des réactions de biotransformation (**Preston et al., 1987**).

L'indice mitotique a été considéré par plusieurs auteurs, le premier paramètre indicatif de l'évaluation de la cytotoxicité, et la perturbation du cycle cellulaire en influençant sur les différents paramètres responsables de la division cellulaire, tout en diminuant ou augmentant son pourcentage par rapport à l'état normal (**Mazumdar et al., 2011**). Le calcul de l'indice mitotique fournit des informations sur le pourcentage de cellules en division. Il est d'environ 18% chez les souris femelles et 19% chez les souris mâles concernant le témoin négatif (CMC à 0,8%) et qui sont comparables à ceux rapportés par **Mazumdar et al., (2010)**.

Le cyclophosphamide est un agent chimique antinéoplasique, alkylant, bifonctionnel, qui est activé après métabolisation essentielle par les enzymes de foie, sa toxicité est due à ses dérivés métaboliques approuvés par plusieurs auteurs (**Emadi et al., 2009 ; Giraud et al., 2010**). Le CP a démontré une diminution significative ($P < 0.05$), indiquant une division cellulaire ralentie, ce qui revient au métabolite secondaire de ce mutagène, qui est la moutarde phosphoramidate, le métabolite alkylant possédant l'activité antitumorale, il génère des formes aziridium qui sont hautement électrophiles et interagissent avec l'ADN ou les protéines. Accompagné d'une augmentation du pourcentage d'aberrations chromosomiques, qui peut se distinguer par un taux considérable de fragmentation et de pulvérisation, dues à l'accumulation répétitive des adduits d'ADN.

Le cyclophosphamide a diminué d'une manière considérable l'IM chez les lots de souris traitées par le CP50 (mg/kg) qui était de 6% chez les mâles aussi bien que les femelles par rapport aux lots témoins négatifs traités seulement par le CMC (18% et de 19%), des résultats comparables aux résultats de **Mazumdar et al., (2010)**. Cet effet était également accompagné par l'augmentation de pourcentage des cellules aberrantes, variant entre 62% et 70% chez les souris témoins positifs (CP à 50 mg/kg) par rapport aux témoins négatifs (13% et 17%), ceci a résulté des différents types d'aberrations chromosomiques et leur abondance.

L'effet de l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* a été comparé au lot témoins négatif et positifs, à des concentrations croissantes (125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg et 1000 mg/kg). L'extrait a agi de façon similaire et presque identique au témoin négatif d'où on peut expliquer cela que l'extrait de feuilles de *F.angustifolia* est non génotoxique aux différentes concentrations. Cependant à ses différentes concentrations de l'extrait éthanolique a montré une signification élevée ($***P < 0.05$) comparativement au lot témoin positif le CP (50mg/kg),

ceci s'explique, que l'extrait des feuilles de *F. angustifolia* a joué un effet anti-génotoxique, cela revient que cet extrait contient des métabolites actifs qui ont pu corriger le pourcentage d'aberrations induites par le CP.

Les dommages réduits lors du traitement avec l'extrait ont été attribués à la présence des polyphénols, ce qui lui a permis une protection contre les dommages oxydants d'ADN induits par le CP et serait capable de protéger contre l'instabilité génomique, démontré par les travaux de **Hertog et al. (1995)**. Les mécanismes antioxydants des polyphénols sont les plus largement décrits pour leurs rôle d'antioxydant protecteur contre les dommages oxydatifs induits sur les différentes biomolécules, incluant l'ADN.

Fergusson (2001) a rapporté d'autres mécanismes par lesquels les polyphénols interagissent avec les différents processus (réplication, réparation et division cellulaire) et cibles cellulaires, afin d'exercer leurs pouvoir mutagènes ou bien protecteurs vis-à-vis des effets délétères du mutagène :

Selon cet auteur, les polyphénols peuvent exercer leurs effets antimutagènes sur la synthèse de l'ADN en empêchant la fixation des mutations, sur la réparation de l'ADN par la réversion des dommages induits par le mutagène (Coumarines et acide tannique), ou encore par l'influence directe de l'activité des enzymes de réparation de l'ADN par la modulation de leur expression (La myricétine).

D'autres polyphénols peuvent agir sur la liaison du mutagène à l'ADN tel que l'inhibition spécifique de l'acide ellagique pour la méthylation de la guanine en position O6. Ce même phénol simple (Acide ellagique) inhibe les poisons des topoisomérases en agissant comme antagoniste des stabilisateurs du complexe de clivage par les Topoisomérases de type I et de type II.

D'autres parts, les lignanes et les lignines ont été rapportées pour leurs effets sur l'adsorption du mutagène, en s'adsorbant fortement aux mutagènes hydrophobes et protéger contre la mutagenèse induite par cette catégorie de composés.

La prévention de la nitrosylation est un autre mécanisme par lequel les phénols simples réduisent la mutagénicité, en effet, l'inhibition de ce processus par les acides gallique, tannique, caféique, chlorogénique et férulique jouent un rôle de défense contre la carcinogénèse par inhibition de la formation des composés N-nitroso.

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (incluant les substances mutagènes) peuvent être également une cible privilégiée par les flavonoïdes en inhibant spécifiquement les cytochromes P450s (CYPs) et protéger de la mutagenèse via ce mécanisme ((**Wood et al.,**

1986). L'activité du cyclophosphamide dans cette étude serait inhibée efficacement par cette voie, car ce sont ses métabolites de bioactivation qui induisent la mutagenèse.

La distribution de l'activité en fonction des doses de l'extrait de feuilles n'était pas similaire et leur biodisponibilité était variable d'une concentration à une autre c'est-à-dire, la dose 250 mg/kg, était plus active car elle atteindra les cibles d'action plus rapidement (absorption et distribution) comparativement à la dose de 1000 mg/kg ayant exhibé presque le même effet que la dose 125 mg/kg.

Les résultats obtenus de cette étude suggèrent que cet extrait, étant un mélange de composés, phénoliques en majorité, aurait inhibé les effets délétères du cyclophosphamide par différents mécanismes en agissant sur une diversité de cibles moléculaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La dose, la partie de la plante utilisée, ainsi que la manière de l'utilisation diffère d'une plante à une autre. Puisque à des grandes concentrations, les extraits de ces plantes peuvent engendrer des effets secondaires et même toxiques pour l'être vivant.

Fraxinus. angustifolia est parmi ces nombreuses plantes douées de ces pouvoirs phytothérapeutiques, néanmoins dépendant de la dose exercerait-elle une toxicité ? Cette étude est réalisée afin d'évaluer les différents effets génotoxiques et antigénotoxiques de l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur la toxicité induite par le mutagène chimique, le cyclophosphamide (50 mg/kg), qui s'applique sur des souris albinos NMRI mâles et femelles.

Le cyclophosphamide est utilisé dans cette présente étude comme un témoin positif, d'où il a montré un effet génotoxique considérable sur les cellules de la moelle osseuse des souris mâles et femelles traitées par cette substance mutagène, alors que l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus. angustifolia* n'a montré aucun signe de génotoxicité malgré qu'il a été utilisé à de différentes concentrations croissantes (125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg et 1000 mg/kg).

Une évaluation antigénotoxique a été réalisée par le test des aberrations chromosomiques par une combinaison faite entre l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* à une dose de 250 mg/kg combiné au cyclophosphamide (50mg/kg) sur des cellules de la moelle osseuse de souris mâles et femelles, qui a montré des résultats prometteurs et ceci d'après une analyse statistique de l'indice mitotique et du taux des aberrations chromosomiques chez ce lot, il y'a eu une diminution significative des aberrations chromosomiques observées chez les souris accompagnée d'une augmentation de l'indice mitotique, ce qui indique que l'extrait de *F. angustifolia* peut inhiber l'effet génotoxique de cyclophosphamide et lutter contre ses dommages d'ADN et cela malgré à une dose de (250 mg/kg).

Les résultats obtenus sur la cytotoxicité et/ou sur la génotoxicité peuvent être d'un grand intérêt et qui vont être exploitables en association avec les traitements anticancéreux, pour éviter ou du moins réduire les effets secondaires de ces traitements dont l'exemple du cyclophosphamide. Ceci en reprenant cet étude pour une optimisation des résultats, identifier les composés bioactifs ainsi que leurs mécanismes d'action.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude constitue une mineure partie d'une grande thématique sur les études de génotoxicité et d'antigénotoxicité qui vont être menées au futur à passer de l'état *in vivo* appliqué sur des souris ou des parties de souris aux études prés-cliniques et cliniques pourquoi pas en produisant des biomolécules à base de principes actifs de feuilles de *F. angustifolia*.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

- Adjobimey, T., Edayé, I., Laghika, L., Genou, J., Moudachirou, M. and Sanni, A. (2004).** Activités antiplasmodiales *in vitro* de quelques plantes antipaludiques de la pharmacopée béninoise. *Compte Rendu de Chimie* 7,1023-1027.
- Atmani, D., Chaher. N., Berboucha. M., Ayouni. K., Lounis. H., Boudaoud. H., Debbache. N., and Atmani. D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* 122, 303-309.
- Ayouni, K., Berboucha. R.M., Kim. H.K., Atmani, D., Verpoorte, R. and Choi, Y.H. (2016).** Metabolic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products*. 13p.

B

- Bailen, B.B. and Bakare, A.A. (2006).** Genotoxicity screening of waste waters from Agbara Industriel Estate, Nigeria evaluated with *Allium* test. *Pollution Research*. 25(2), 227-234.
- Beloued, A., 1998.** Plantes Médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaires*, Alger, pp.277.
- Beloued, A. (2009).** Les plantes medicinales d'Algerie, technicien superieur, département de botanique à l'institut nationale agronomique d'El-harrach-Alger, 5^{ème} édition, Ed office des publications universitaires, 100p.
- Botta, A. (2002).** Relations entre génotoxicité, mutagénèse et cancérogénèse. *Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP*, Annales 28:9-13.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales, 3^{ème} édition, lavoisier, Paris, 1120 p.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

C

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

-Çalis, I., Hosny, M. and Lahloub, M. F. (1995). A socoiridoid glucoside from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry*, 41: 1557-1562.

-Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.*, 47, 936-942.

Chabrier J. Y., 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. *Thèse de doctorat en pharmacie*, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165.

-Champoux, J.J. (2001). DNA Topoisomereses : Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev.Biochem.* 70, 369-413.

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

D

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

-Djerroumi, A. and Nacef, M.(2004). 100 plantes medicinales d'Algerie.,palais de livre, pp:45-110.ISBN :9961-749-25-1.

-Donath, F., Quispe, S., Diefenbach, K., Maurer, A., Fietze, I., Amaral, K. M., Schenkel, E. P. and Laangeloh, A. (2000). Avaliacao da toxicidadere productivados extratososlio filizados de *Passiflora alata* Dryander *Passifloraedulis* Sims emratas Wistar. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 20, 215-220.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

E

- Ebrahimi, L., Habibi-khorassani, M., Badichi, A.F., Farrokhzadeh, A. and Karimi, P. (2013). Caffeine as base analogue of adenine or guanine: a theoretical study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 42, 81-91.
- Ekhart, C., Doodeman, V.D., Rodenhuis, S., Smits, P.H., Beijnen, J.H., and Huitema, A.D. (2008). Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenetics and genomics* 18, 515-523.
- El Yamani, M. and Barrillon. A. (2006). Agents: Substances chimiques. Afesset. 6p.
- Emadi, A., Jones, R.J., and Brodsky, R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews Clinical oncology* 6, 638-647.

F

- Fakchich, J., Elachouri, M. (2014). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments; *Journal of Ethnopharmacology* 154, 76-87.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. and Guo, Z. (1986). Places des plantes medicinales dans la therapeutiques. *bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*, 64(2) : 159-164.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475, 89-111.
- Fernandes, L.M., Gersez, W.S., Montovani, M.S., Figueiredo, P.O., Fernandes, C.A., Garsez, F.R, and Guterres, Z.R. (2013). Assesment of the in vitro and in vivo genotoxicity of extracts and indole monoterpene alkaloid from the roots of *Galianthe thalictroides*(rubiaceae). *Food and chemical toxicology* 59,405-411.
- Ferreira, F., Kemmelmerier, C., Arrotéia, C., Costa, C. and Mallmann, C. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food chemistry* 136, 789-793.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Fornace, A. J. and Kohn, K. W. (1976).** DNA-protein cross-linking by ultraviolet radiation in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts, *Biochem. Biophys. Acta*, 435, 95-103.
- Fraxigen (2001).** Ash species in Europe. Biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. A summary of findings from the FRAXIGEN project, EU project EVK2-CT-00108. 26p.

G

- Galabov, A.S., Iossifova, T., Vassileva, E. and Kostova, I. (1996).** Antiviral activity of some hydroxycoumarin derivatives. *Z Naturforsch C*, 51:558-562.
- Gerard, P. (2006).** Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière : l'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior L.* et *F. angustifolia Vahl*). these de Doctorat en sciences Forestières. Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts, centre de : Paris. 29-34.
- Garcia, D., Garcia-Cela, E., Antonio, J., Ramos, V. and Marin, S. (2011).** Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *stevia rebaudiana* extracts. *Food Control* 22, 1378-1384.
- Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J.C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., Martin, H., Beaune, P., and de Waziers, I. (1999).** Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 9, 295-306.
- Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, G.J., Vassal, G., and Paci, A. (2010).** Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6, 919-938.
- Guignard, J. L. (2000).** Biochimie végétale, 2^{ème} édition, Du nord, Paris. P164-173.
- Guiraud, J.P. (1993).** Génétique microbienne : Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Techniques et documentation – Lavoisier. p : 89-111.

H

- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappertt, U., Lowe, P., Suter, W., and Mueller, L. (2004).** Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic. Bamako(Mali): 53.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-Hertog M. G. L., Kromhaut, C., Aravanis, C., Blackburn, R., Buzina, F., Fidanza, S., Giampaoli, A., Jansen, A., Menotti, S., Nedeljkovic. (1995). Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, *Arch. Int.Med.* 155, 381-386.

-Hosny, M. (1998). Secoiridoid glucosids from *Fraxinus oxycarpa*. *phytochemistry*, 45:1569-1576.

J

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

K

Kerharo, J. and Adam, J.G. (1964). Plantes médicinales et toxiques des Peul et des Toucouleur du Sénégal. *Journal d'agriculture tropicale et botanique appliquée.* Vol 11 :10, 384-444.

-Khallef, M., Merabet, R. and Benouareth, D. E. (2014). Undesirable effects of drinking water chlorination by-products. *Journal of Toxicology and Enviromental, Health sciences.* Vol. 6(2), pp. 26-30.

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

-Kruch, J. (1982). Biochimie : Etude médicales et biologiques. Vol1 Biologie cellulaire et moléculaire. Hemann Paris. p 31-238.

L

-Lapointe, G. (2004). Notions de toxicologie. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec. 67p.

-Lares, R. M., Jr. and Penner, J. A. (1977). Refactory thrombocytopenic purpura treated successfully with cyclophosphamide. *J. Am.med. Assoc.* 215, 445-449.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-Le Grand, A. (1989). Les phytothérapies anti-infectueuses de la forêt-savane, Sénégal (Afrique occidentale) : un résumé des substances phytochimiques et l'activité anti-microbienne de 43 espèces. *Journal of Ethnopharmacology*, 25, 315-338. BERTI Editions. p : 101-115.

-Livingston, R. B. and Carter, S. K. (1970). Cyclophosphamide. In: *Single Agents in Cancer Chemotherapy*, Plenum, New York. 25-80.

M

-Ma, W. G., Tanr, X., Fuzzati, N., Li. Q. S., Wolfender, J. L. and Hostettmann, K. (1997). Natural occurring and synthetic polyene glycosides. *Phytochemistry*, 45(2): 411-415.

Mazumdar, M., Giri, S. and Giri, A. (2010). Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations *in vivo*. *Mutation Research/ Genetics Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 721, 147-152.

-Michel, C. (2011). Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha*: indicateur de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Thèse de Doctorat en Ecotoxicologie. Ecole Doctorale Géosciences et Ressources Naturelles. Université Pierre et Marie Curie Paris VI. 218p.

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

N

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

O

-OCDE. (21 juillet 1979). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guide line for the testing of chemicals. 23p.

-OCDE. (2008). Etude de toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours sur les rongeurs. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Vol 1, number 4. OCDE, Paris, pp 1-14.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-OCDE. (2009). Etude de toxicité chronique. In *Lignes directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Vol 1, number 4. OCDE, Paris, pp 1-16.

-Oliver, J. A. (1986). Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies. In *Chemicals Testing and Animal Welfare* (The National Chemicals Inspectorate), Solna Sweden. pp 119-142.

OMS. (2002). Strategies de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Organisation Mondiale de la Santé, Genève. 65p.

P

-Papanikolaou, I. (2003). Allergie aux pollens de frêne (*Fraxinus excelsior*), *Strasbourg: université Louis-Pasteur*.

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

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 Research*, 189, 157-165.

R

-Repcak M., Imrich J., Fanekova M., (2001).Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomillarecutita* (L) Rauschert. *Plant Physiol*, **158**: 1085: 1087.

-Rhodes, C., Thomas, M. and Athis. J. (1993). Principales of testing for acute toxic effects. In *General and Applied Toxicology*. Vol 1(edited by B.Ballantyne, T. Marrs, P.Turner), Stockton Press, New York. Pp 49-87.

S

- Sanago. R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. *Université Bamako(Mali)*: 53.

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

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Saunders, P. R. (2005)**. Un guide pratique des plantes medicinales pour les personnes vivant avec le VIH. Canadian AIDS Treatment Information Exchange (CATI). 54p.
- Schorderet, M. (1992)**. Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. OPU. Alger, 918p.
- Scopel, R., Falcao, A., Aline, M., Rafael, N., Almeida, H., Gandolfi, C., Rubem, M. and Vargas, E. (2014)**. Supercritical Fluid Extraction from *Syzygium aromaticum* Buds: Phase Equilibrium, Mathematical Modeling and Antimicrobial Activity. *The Journal of Supercritical fluids*, 56, 1234-1244.
- Steven, J., Clifton, K., Ward, D. and Ranner, S. (1997)**. The status of juniper *Juniperus communis* L. In northeast England. *Biological Conservation* 97, 67-77.
- Strang, C. (2006)**. Larousse médicale. Ed Larousse.

T

- Toyokoni, S., Tanaka, Y., Hattori, Y., Nishiyama, A., Yoshida, K., Uchida, H., Hiai, H., Ochi and osawa, T. (1997)**. “Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model.” *Laboratory investigation* 76: 365-374.
- Trevan, J. (1927)**. The error of determination of toxicity. *Proc. Roy. Soc.*, 101B: 483-514.
- Tshebiso, J., Makhafola, L.J., Jacobus, M. and Eloff, N. (2014)**. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of five *Ochna* species (Ochnaceae) with excellent antibacterial activity. *South African Journal of Botany* 91, 9-13.

W

- Wallander, E. (2008)**. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant System Evolution*, 273, 25-40.
- Walum, E. (1998)**. Acute Oral Toxicity. *Env. Health Persp.*, 106: 497-503.
- Winter, P C G. I. Hickey; H. L Fletcher, (2000)**. L'essentiel en génétique. Port Royal livres. BERTI Editions. p: 101-115.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-Wood, A.W., Smith, D. S., Chang, R. L., Huang, M-T., Commey, A. H. (1986). Effects of flavonoids on the metabolism of xenobiotics, in: V. Cody, E. Middlerton Jr., J.B. Harborne (Eds), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, AR, Liss Inc., New York: 195-210.

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

Annexe : Tableaux récapitulatifs des observations faites sur les groupes de souris mâles et femelles aux différentes doses de l'extrait de *F. angustifolia* (125, 250, 500 et 1000 mg/kg).

souris	Type de lame	cell. Division	Interphase	Met. spread	total	Aberration chromosomique							Nbr de cell (Aberratio)	I.M
						Gap(nbr cell)	Ring	Fragment	Del.chrom	Ass. cent	Pulverisation	Pol ypl oide		
souris1	GFF ♂ 125 (1,1')	1761	17209	100	18970	1(1cell)	0	21(14cell)	²	11(8cell)	0	0	22	9.283078545
souris2	GFF ♂ 125 (2,2')	3596	17091	100	20687	0	3(3cell)	3(2cell)	4(4cell)	14(11cell)	0	6	21	17.38289747
souris3	GFF ♂ 125 (4,4')	3646	13467	100	17113	0	1	7(5cell)	0	5(4cell)	0	2	11	21.30544031
souris4	GFF ♂ 250 (1,1')	4489	15130	100	19619	0	0	4(3cell)	3(3cell)	17(14cell)	0	4	20	22.88088078
souris5	GFF ♂ 250 (2,2')	3373	11462	100	14835	0	0	0	0	12(11cell)	0	2	14	22.73677115
souris6	GFF ♂ 250 (6,6')	3377	15809	100	19186	1	6(5cell)	4(4cell)	8(7cell)	19(14cell)	0	0	26	17.601376
souris7	GFF ♂ 500(3,3')	1245	8210	100	9455	6(5cell)	0	20(15cell)	18(15cell)	21(16cell)	0	0	30	13.16763617
souris8	GFF ♂ 500(6,6')	1614	10126	100	11740	32(23cell)	0	8(6cell)	9(7cell)	12(7cell)	0	6	38	13.74787053
souris9	GFF ♂ 500(2)	9591	18399	100	27990	0	0	0	0	4(3cell)	2	1	5	34.26580922
souris10	GFF ♂ 1000 (1)	2136	13490	100	15626	6(5cell)	1	37(19cell)	31(18cell)	18(16cell)	0	0	37	13.66952515
suoris11	GFF ♂ 1000 (2,2')	1894	13227	100	15121	21(16cell)	1	18(13cell)	19(14cell)	8(8cell)	0	3	40	12.52562661
souris12	GFF ♂ 1000 (4,4')	2612	19179	100	21791	6(5cell)	3	13(10cell)	14(12cell)	6(5cell)	0	3	23	11.98659997

souris	Type de lame	cell. Division	Interphase	Met. spread	total	Aberration chromosomique							Nbr de cell (Aberratio)	I.M
						Gap(nbr cell)	Ring	Fragment	Del.chrom	Ass. cent	Pulverisation	Pol ypl oide		
souris1	GFF ♀ 125	3426	11638	100	15064	0	1	2	3	16	0	1	17	22.742963
souris2	GFF ♀ 125	8376	12671	100	21067	0	0	0	0	12	0	0	8	39.8538
souris3	GFF ♀ 125	4052	11886	100	15938	0	2	2	1	14	0	0	12	25.423516
souris4	GFF ♀ 250	3757	13250	100	1707	0	0	0	2	1	0	0	2	22.090904
souris5	GFF ♀ 250	5766	12993	100	18759	0	0	2	0	7	0	3	10	30.737246
souris6	GFF ♀ 250	4387	10725	100	15112	0	0	0	0	7	0	0	5	29.02991
souris7	GFF ♀ 500	4231	18995	100	23226	4	0	3	0	5	0	0	5	18.216654
souris8	GFF ♀ 500	4995	9010	100	14005	5	1	2	1	5	0	3	2	35.665834
souris9	GFF ♀ 500	2986	6159	100	9145	0	0	11	2	0	0	0	9	32.651722
souris10	GFF ♀ 1000	5471	13531	100	19002	0	3	2	0	10	1	3	14	28.791706
suoris11	GFF ♀ 1000	3845	10374	100	14219	0	0	0	0	6	0	3	8	27.041283
souris12	GFF ♀ 1000	3498	9205	100	12703	6	1	0	0	9	0	1	10	27.536802

Résumé

Fraxinus angustifolia (Oleacées), est une plante médicinale très répandue et utilisée dans la région méditerranéenne pour ses diverses vertus thérapeutiques telles que la goutte et l'arthrite.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets génotoxiques/antigénotoxiques de l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur la toxicité induite par un agent mutagène chimique, cyclophosphamide, en utilisant le test de génotoxicité des aberrations chromosomiques qui permet d'évaluer l'impact de ce mutagène sur le génome d'une souris.

Les expériences ont été effectuées sur des lots de souris mâle et femelle (NMRI) à qui ont été administré des concentrations croissantes de l'extrait, 125mg/kg, 250mg/kg, 500g/kg et 1000mg/kg, pendant 7 jours consécutives pour le test de génotoxicité. Ces traitement ont été comparés au lot témoin négatif (administration du CMC 0.8%). Le test d'antigénotoxicité a été réalisé à une concentration de 250 mg/kg a qui a été injecté au cyclophosphamide au bout du 7eme jour. Un lot témoin positif a reçu du CMC pendant les 7 jours, suivi de l'injection du cyclophosphamide.

D'après les observations microscopiques et le calcul des indices mitotiques pour l'extrait éthanolique de feuilles de *F.angustifolia* n'a montré aucune diminution de l'indice mitotique comparativement au lot témoin négatif, un résultat associé à des taux réduits d'aberrations chromosomiques pour toutes les doses testées, ce qui signifie que l'extrait est non génotoxique.

Le cyclophosphamide a indiqué un déclin dans l'indice mitotique et une augmentation significative des aberrations chromosomiques, ce qui lui attribut l'effet génotoxique. Un effet antigénotoxique a été observé pour l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* à une dose de 250mg/kg, ceci par l'augmentation de l'indice mitotique et la diminution des taux d'aberrations chromosomiques comparativement aux témoins positifs.

Cette étude a montré que l'extrait de *F.angustifolia* a exhibé une effet protecteur sur les divisions cellulaires et les aberrations chromosomiques et peut être exploré par d'autres études pour l'identification des composés bioactifs et des mécanismes d'action précis.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, Génotoxicité/Antigénotoxicité, Cyclophosphamide, Aberrations chromosomiques, Indice mitotique.

Abstract

Fraxinus angustifolia (Oleaceae), is a popular herb in the Mediterranean region for its various therapeutic properties such as gout and arthritis.

The aim of this study is to evaluate the genotoxic / antigenotoxic effects of ethanol extract of leaves of *Fraxinus angustifolia*. Toxicity was induced by a chemical mutagenic agent, cyclophosphamide, using the chromosomal aberrations genotoxicity test that evaluates the impact of this mutagen on the genome of a mouse.

The experiments were performed on male and female mice (NMRI), which were administered increasing concentrations of the extract, 125mg / kg, 250mg / kg, 500 g / kg and 1000mg / kg for 7 consecutive days to test their genotoxicity. These treatments were compared to the negative control group (administration of CMC 0.8%). Anti-genotoxicity test was performed by a concentration of 250 mg/kg and was injected cyclophosphamide after the 7th day. Positive control group received CMC for 7 days and the Cyclophosphamide (50 mg/kg).

According to microscopic observations and mitotic index calculations, the ethanol leaf extract of *F.angustifolia* didn't show any decrease in mitotic index compared to negative control, associated to low aberrations levels indicating that these extracts didn't exert genotoxic effects. Unlike cyclophosphamide reported a decline in the mitotic index and a significant increase of chromosomal aberrations that attribute him the genotoxic effect. *F.angustifolia* extract at 250mg/kg showed a significant antigenotoxic effect according to an increase of mitotic index in the group of cyclophosphamide previously treated with this dose of extract.

This study showed that *F.angustifolia* exhibited a protective effects on cell divisions and chromosomal damages, and can be explored by further investigations for compounds identifications and more precise mechanisms of action..

Keywords: *Fraxinus angustifolia*, Genotoxicity/Antigenotoxicity, Cyclophosphamide, Chromosomal aberration, Mitotic index.