

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique Appliquée

Thème

Etude de la génotoxicité des extraits de *Fraxinus* *angustifolia* par le test Ames

Présenté par : OUDAI Rédha
TOUAHRI Ouardia

Composition du jury

M^{me} S.ABDERRAHIM (MAA)

Président

M^{lle} N.CHAHER (MAA)

Promotrice

M^r R. LAADJOUZI (MAA)

Examineur

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciements

Dieu merci de nous avoir donné la santé, le courage, la volonté et de nous avoir guidé vers le droit chemin tout au long de nos études et pour bien réaliser ce travail.

Nos sentiments de reconnaissance, s'adressent à notre promotrice M^{elle} CHAHER, N d'avoir accepté de diriger ce travail. -On la remercie pour sa simplicité, sa gentillesse ses conseils précieux et sa bonne -humeur.

Nous tenons également à présenter nos vifs remerciements à M^{me} ABDEERAHIM. S qui nous a fait un immense honneur de présider notre jury d'examen et d'évaluer ce travail.

Nous remercions vivement M^r LAADJOZI. R qui a accepté d'évaluer notre étude en faisant part de ses remarques et suggestions.

Un remerciement très profond et particulier à M^{elle} BOUGUELLID.G, étudiante en troisième année Doctorat Biochimie au Laboratoire de Génétique, a vrai dire nous ne savons pas comment vous remercier, pour tout ce que vous nous apporté, transmis et appris lors de ce travail, merci pour l'énorme contribution que vous avez apportée afin de mener à bien ce travaille, bon courage à toi aussi.

Nous remercions aussi toute l'équipe du Laboratoire Génétique et tout particulièrement M^{me} ATMANI.D, M^{me} AYOUNI.K et M^{me} BERBOUCHA.M, les doctorantes Farah, Saliha et Malika, sans oublier Naima la technicienne du Laboratoire ainsi que nos camarades pour leurs esprits d'équipe.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ainsi que ceux qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment ; qu'ils trouvent le témoignage de notre profonde gratitude.

Enfin, nous remercions chaleureusement nos familles et nos proches, particulièrement nos parents pour leur soutien moral et matériel qu'ils nous ont apporté tout au long de nos études.

Rédha et ouardia

Dédicace

*A mes très chers parents, en signe de
Reconnaissance pour leur amour, leur
Tendresse, leur compréhension et tous
Leurs sacrifices*

*A mes frères et ma sœur de m'avoir
Soutenue et surtout supportée durant
Toutes ces années d'étude
A toute la famille Oudai*

*Ma camarade warda ainsi que toute la promotion
Généétique 2016 et spécialement à **M^{elle}Bougallid, G** qui
m'a aidé vraiment.*

A mes meilleurs amis et à tous mes amies

REDHA

Dédicaces

Voilà le jour arrive, le jour de ma soutenance, à vrai dire de votre soutenance.

C'est grâce à vous que je suis maintenant ici, c'est grâce à votre aide, votre soutien et votre compréhension, c'est à vous mes chers parents que je dédie ce travail, que Dieu vous garde toujours pour moi.

Je le dédie à vous mes précieux frères : Aziz, Halim, Arezki, Sofiane, Yacine, Mohamed et Hichem. Que Dieu vous garde toujours à mes cotés et qu'il nous garde toujours unis.

A :

Mes belles sœurs : Souad, Naima, Amel, Didaet Farida.

Vous mes adorables neveux et nièces : Manel, Raouf, Imane et Lynaqui me font toujours sourire

Mes oncles et tantes et spécialement Tata Samia et toute sa famille pour l'accueil chaleureux et l'amour qu'on m'a offert.

Cousins et cousines que j'adore énormément.

Mon meilleur groupe d'amies ; groupe du choc : Fatima, Yasmine, Kahina, Yasmina, Amina, Meriem et Salima qui ma aidée vraiment que Dieu garde toujours notre amitié.

Mon camarade Redha, ainsi que toute la promotion Génétique 2016 et spécialement à M^{elle}Bougallid, G qui m'a aidé vraiment.

Toute personne chère pour moi, je vous dédie ce travail et que Dieu nous garde toujours ensemble et qu'il me donne de la puissance pour vous faire tous plaisir.

Ouardia

Liste des abréviations

2-AF : 2-aminofluorène

AP : Apurine

CAP : Centre antipoison

DNTP : Di nucléotide triphosphate

E.coli : *Escherichia coli*

EMS : Ethylméthane sulfonate

His : Histidine

MMS: Methyl methane sulfonate

NADP: β -nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate disodium

NG: Nitrosoguanidine

RM: Ration de mutagénicité

SD: Standard deviation

Trp: Tryptophane

UV: Ultraviolet

UvrA : Ultraviolet repair A

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photographie de la plante <i>Centaurium erythraea</i>	5
Figure 2: Photographie de la plante <i>Matricaria recutita</i>	5
Figure 3: Photographie de la plante <i>Crataegus oxyacantha</i>	5
Figure 4: Photographie de la plante <i>Ginkgo biloba</i>	6
Figure 5: Photographie de la plante <i>Hedera hélix</i>	6
Figure 6: Photographie de l'arbre <i>Fraxinus angustifolia</i>	8
Figure 7: Structure chimique (A) des tanins hydrolysables, (B) des tanins condensés	12
Figure 8: Structure chimique de quelques secoridods.....	13
Figure 9: Structure chimique de verbascoside.....	13
Figure 10: Structure chimique des lignanes de <i>Fraxinus angustifolia</i>	14
Figure 11 : Principaux types de dommages à l'ADN causés par des agents exogènes ou endogènes, ainsi que les voies de réparations associées.....	16
Figure 12: Exemple d'analogue de base 5bromo-uracile et le mode d'interaction avec la guanine.....	17
Figure 13 : Principaux site d'action des agents alkylants.....	18
Figure 14 : Les diverses cibles des agents génotoxiques.....	20
Figure 15: Organisation de l'opéron tryptophane.....	24
Figure 16: Représentation schématique de la régulation de l'opéron Tryptophane.....	25
Figure 17 : Représentation de système de réparation SOS.....	26
Figure 18: Photographies de l'écorce (A) et des feuilles(B) de <i>Fraxinus angustifolia</i>	27
Figure 19 : Des feuilles (A) et d'écorce (B) de <i>Fraxinus angustifolia</i> après séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière.....	28

Figure 20 : A : Macération B : Décantation C : Séchage avec reta- vapeur.....	29
Figure 21 : L'exposition des boites aux UV pendant 12 S.....	30
Figure 22: Le contrôle de la résistance à l'Ampicilline et la mutation <i>rfa</i>.....	31
Figure 23 : L'injection de l'inducteur Aroclor 1254.....	32
Figure 24 : Quelques étapes de préparation de la fraction S9.....	32
Figure 25 : Présentation schématique du test de mutagenicité par la méthode d'incorporation d'<i>E.coli</i> WP2 (pKM101).....	32
Figure 26 : photographie de test croissance bactérien <i>E.coli</i> WP2 (<i>pkM101</i>) en milieu riche de tryptophane.....	36
Figure 27 : Résultats de l'exposition de la souche <i>E.coli</i>WP2 (pKM101) aux UV.....	37
Figure 28 : Présentation de la mutation <i>rfa</i> et la résistance à l'Ampicilline.....	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Exemples de quelques plantes médicinales et leurs effets thérapeutiques.....	5
Tableau II : Différents types de coumarines existant chez <i>Fraxinus angustifolia</i>	10
Tableau III : Différentes structures des flavonoïdes.....	11
Tableau IV: Tableau représentant les caractéristiques de la souche WP2 (pKM101).....	30
Tableau V: Résultats du test de mutagénicité sans S9 sur la souche <i>E.coli</i> WP2 (pKM101)..	38
Tableau VI: Résultats du test de mutagénicité avec S9 sur <i>E.coli</i> WP2 (pKM101).....	39
Tableau VII: Résultats du test d'antimutagénicité sans activation métabolique S9.....	41
Tableau VIII : Résultats du test d'antimutagénicité de la souche <i>E.coli</i> WP2 (pKM101) avec l'activation métabolique S9.....	42

SOMMAIRE

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

Chapitre I : Etude Bibliographique

I.1 La phytothérapie.....	3
I.2 Présentation de la plante <i>Fraxinus angustifolia</i>	7
I.3 Principes actifs et propriétés thérapeutiques de <i>Fraxinus angustifolia</i>	9
I.4 Source, effets et outils de détection des altérations de matériel génétique.....	15

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1 Matériel.....	27
II.1.1 Matériels et produits chimiques.....	27
II.1.2 Matériel végétal.....	27
II.1.2.1 <i>Fraxinus angustifolia</i>	27
II.1.2 Les animaux du laboratoire.....	28
II.1.4 Les souches bactériennes.....	28
II.2 Méthodes	
II.2.1 Préparation des échantillons de <i>Fraxinus angustifolia</i>	28
II.2.2 Extraction.....	29
II.2.3 Test de génotoxicité.....	29
II.2.3.1 Contrôle de génotype d' <i>Escherichia coli</i>	30
II.2.3.2 Système d'activation métabolique.....	31

II.2.3.3 Test de mutagénicité/ antimutagénicité.....	33
II.3 Analyse statistique.....	35

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1 Résultats.....	36
III.1.1 Résultats de l'extraction.....	36
III.1.2 Résultats du contrôle de génotype d' <i>E.coli</i> WP2 (pKM101).....	37
III.1.3 Résultats du test de mutagénicité et d'antimutagénicité.....	38
III.1.3.1 Résultats du test de mutagénicité.....	38
III.1.3.2 Résultats du test d'antimutagénicité.....	40
III.2 Discussions.....	43
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	50

Annexes

INTRODUCTION

A l'origine, la Nature constituée d'être végétaux, servaient d'alimentation aux animaux et aux Homme peuplant la terre. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, l'Homme découvrait bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes, notamment le pouvoir de guérison.

En effet cette faculté de guérison des plantes fut connue longtemps par nos ancêtres. Elle deviendra plus tard la médecine traditionnelle avec toutes les avancées notoires de plantes médicinales qu'on a pu lui attribuer (**Beloued, 1998**).

Plus de 3000 plantes sont qualifiées de plantes médicinales pour leur pouvoir de guérison et leur potentiel thérapeutique qu'il est possible d'utiliser ; entier ou les produits d'extraction qu'elles fournissent.

Ainsi un grand nombre de médicaments utilisés à travers le monde dérivent directement par extraction ou indirectement par hémisynthèse des plantes médicinales (**Marc, 2001 ; Shretha, 2004 ; Arome et Chinedu, 2013**).

Dans les pays en voie de développement, les plantes sont souvent utilisées comme une alternative thérapeutique à la médecine moderne pour plusieurs de leurs propriétés, à savoir Antiseptiques, Analgésiques et Anti-inflammatoires. En effet approximativement 80% de la population africaine ont considéré les plantes médicinales la principale source de leurs soins (**Bellik, 2012**). Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles, c'est pour cela l'étude thérapeutique s'avère souvent d'une importance majeure, afin de traduire ce savoir traditionnel en un savoir scientifique dans le but de le revaloriser, de le conserver ainsi de connaître la partie, les constituants et la dose toxique et non toxique de la plante et de l'utiliser d'une manière rationnelle.

Dans la phytothérapie, les principes actifs qui sont derrière l'effet thérapeutique des plantes médicinales se trouvent répartie entre les différentes parties de ces dernières (feuilles, fruits, racines ...), influencent le type de métabolites extraits, qui peuvent être des agents antioxydants et anti-inflammatoires , aussi jouent un rôle dans la protection contre de nombreuses maladies chez l'Homme telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Wargovich et al., 2001 ; Tsao et al. , 2004 ; El Beyrouthy et al ., 2008**).

INTRODUCTION

De ces nombreuses plantes médicinales, notre étude s'est portée sur *Fraxinus angustifolia* qui est une plante oléacée, spécifique du bassin méditerranéen, voire de la région Kabyle d'Algérie (**Gerrard, 2006 ; Beloued, 2009**).

Le but de cette étude est de tester l'effet génotoxique de l'extrait brut de feuilles et des écorces de *Fraxinus angustifolia*, par un test de mutation génique (test d'Ames) qui permet d'évaluer l'impact d'une substance chimique sur le génome d'une espèce procaryote.

I.1 La phytothérapie

I.1.1 Les plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capable de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg, 2013**), il y a environ 500 000 plantes sur terre parmi les quelles environ 20 000 possèdent des propriétés médicinales (**Small et Catling, 2000**), pendant longtemps ont été utilisées naturellement sous forme de tisanes ou de poudres ; beaucoup sont actuellement présentées en gélules. Quelle que soit leur présentation, elles jouissent d'un regain d'intérêt largement suscité et entretenu par la publicité ainsi que par d'innombrables ouvrages de vulgarisation (**Bézanger-Beauquesne et al., 1986**).

I.1.2 Historique des plantes médicinales

Depuis des milliers d'années, l'homme a su exploiter les richesses naturelles qui l'entouraient pour se nourrir et se soigner. C'est en consommant les baies, les feuilles et les racines des végétaux qui poussaient autour de lui et en observant les effets qu'ils avaient sur le bétail et sur lui-même qu'il a progressivement identifié les propriétés curatives des plantes. Sur chaque continent, se sont ainsi développées différentes traditions, basées sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil des générations (**Houdret, 2004**).

Déjà 40 000 ans avant notre ère, les thérapeutes aborigènes d'Australie utilisaient les plantes notamment les feuilles de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé). Ce sont surtout les thérapeutes chinois, égyptiens, grecs, romains et arabes qui ont progressivement orienté l'utilisation des plantes à des fins médicales et cosmétologiques. En Afrique, en Europe, en Chine ou en Inde, la médecine traditionnelle s'appuie toujours sur les vertus de ces plantes (**Houdret, 2004**).

I.1.3 La phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de mots grecs qui signifient essentiellement « Soigner avec les plantes » (**Benhamza, 2008 ; Christelle, 2009**).

La phytothérapie existe depuis longtemps et tire ses ressources exclusivement des plantes en utilisant des posologies courantes et classiques (**Benhamza, 2008**), et on entend par phytothérapie le traitement curatif ou préventif des maladies et des troubles subjectifs par

l'utilisation de préparations obtenues à partir de plantes entières ou d'organes de plantes, feuilles, racines, fruits, graines. Les plantes ainsi employées sont communément appelées plantes médicinales (**Fintelmann et Weiss, 2004**), qui peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Christelle, 2009**).

➤ **La phytothérapie en Algérie**

Pendant long temps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales ont été le principale, voir l'unique recours de la médecine. L'Algérie bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuse, et également sahariennes. Ces plantes constituent des remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatifs et préventif (**Mahmoudi, 1986 ; Beloued, 1998**).

Dans les grandes villes comme Alger, il existe des herboristes, essentiellement au niveau des marchés, et leurs étals sont fréquentés par un large public de l'adepte assidu, convaincu des bienfaits des médecines douces, au patient indigent en quête d'un traitement accessible, ainsi les herboristes délivrent oralement de véritables ordonnances, avec posologie durée de traitement et la voie d'administration (**Hammiche et al ., 2013**), cependant il est indiqué que le centre antipoison d'Alger (CAP) , et pour la période de 1991 à 2004 ,a enregistré 114 appels sur 28,221 signalés concernant des cas d'intoxication par des plantes à visée thérapeutique (**Djedioui, 2010**).En effet il est impératif pour les chercheurs et les médecins de mieux informer sur les risques de l'automédication .

Tableau I : Exemples de quelques plantes médicinales et leur effet thérapeutique

La plante médicinale	Indications et L'effet thérapeutique
 <p>Figure 1 : Photographie de la plante <i>Centaurium erythraea</i> (https://www.kuleuven-kulak.be/, 2004)</p>	<p>Efficace dans le traitement de l'achylie gastrique post infectieuse (Fintelmann et Weiss, 2004)</p>
 <p>Figure 2 : Photographie de la plante <i>Matricaria recutita</i> (http://www.visoflora.com, 2011)</p>	<p>Spasmes et affections inflammatoires du tractus gastro-intestinal, inflammations gingivales, cutanées et muqueuses (Fintelmann et Weiss, 2004)</p>
 <p>Figure 3 : Photographie de la plante <i>Crataegus oxyacantha</i> (http://www.fruitiers-rares.info, 2004)</p>	<p>Diurétique, Sédatif et anxiolytique (Maistro et al, 2015). Antispasmodiques (Leclerc, 1994)</p>



Figure 4: Photographie de la plante *Ginkgo biloba* (www.flickr.com, 2011)

Traitement d'asthme, maladies cardiovasculaires (Troubles de la circulation artérielle périphérique) et maladies cérébraux-vasculaires (**Yan et al ., 2015**)



Figure 5 : Photographie de la plante *Hedera hélix* (www.woodlands.co.uk, 2009)

Antibactérien, Anti-inflammatoire, mucolytique, affection bronchiques inflammatoire chronique, Activité antispasmodique (**Mendel et al., 2011**)

Les phytochimistes ont attribué une grande importance au règne végétal, notamment l'étude des extraits des plantes et leurs teneurs en principes actif. L'Algérie est très riches en plantes médicinales mais leurs exploitation restent toujours restreintes et les recherche scientifique ne sont pas très avancées, *Fraxinus angustifolia* est parmi ces plantes médicinales (**Beloued, 2009**).

I.2 Présentation de la plante *Fraxinus angustifolia*

Fraxinus angustifolia ou le frêne oxyphylle appartient à la famille des oléacées, qui sont des plantes ligneuses des régions tropicales et tempérées (**Guignard, 1989 ; Kostova et Iossifova, 2007**). Cette famille comprend environ 600 espèces dans le monde, réparties dans 25 genres (**Hegnaner, 1990**). *Fraxinus* est le plus répondu, comprend 70 espèces largement distribuée en Europe, en Asie de l'est et du nord et en Amérique centrale (**Wei et Green, 1996 ;**

Wallander, 2008). *Fraxinus angustifolia* est un arbre ou arbuste méditerranéenne, avec le peuplier occupe beaucoup de région arrosées de l'Algérie et très utilisée par la population (Baba Aissa, 1990). Cette plante préfère les sols riches en bases avec Ph basique à neutre. On le trouve aux bords des eaux, des bois et des habitations (Rameau *et al.*., 1989).

I.2.1 Description botanique de la plante *Fraxinus angustifolia*

Fraxinus angustifolia est un arbre qui atteint de 8 à 20 m de hauteur, à écorce lisse de couleur grise (Baba Aissa, 1990), avec des feuilles grandes (12 à 25 cm) comportant de 5 à 13 folioles qui sont légèrement dentées, de forme longitudinale et pointue à leur extrémité (Figure 6). Les bourgeons sont brunâtres et les inflorescences sont en grappe allongée et longue (3 à 7 cm) (Belloued, 2001 ; Belloued, 2009). Les fruits de *Fraxinus angustifolia* sont de forme ovale, aigue au sommet, les graines sont plus longues que l'aile. C'est une espèce hermaphrodite avec pollinisation anémogame (Rameau *et al.*, 1989 ; Belloued, 1998 ; Bailly, 2004). La longévité de cette plante est de 150 à 200 ans (Gerard, 2006) .

➤ Appellation de *Fraxinus angustifolia*

- ✚ Appellation vernaculaire berbère : Taslent, Tasselène, Aslèn, Islen, Asselène, Tabouchicht (Mahmoudi, 1998 ; Belloued, 2001).
- ✚ Appellation vernaculaire arabe : Sella, Rasleut, Dardar, Mesharonne, Lessane el acefour, Dardar (Mahmoudi, 1998 ; Belloued, 2001).
- ✚ Appellation scientifique : *Fraxinus angustifolia* de mot grec fraxis (Belloued, 2001).



Figure 6: Photographie de l'arbre *Fraxinus angustifolia*

➤ **Classification de *Fraxinus angustifolia***

- **Règne :** Végétal
- **Embranchement :** Spermaphytes
- **Sous embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotylédones
- **Sous classe :** Astéridées
- **Ordre :** Oléales
- **Famille :** Oléacées
- **Sous famille :** Oléoidées
- **Genre :** Fraxinus
- **Espèce :** *Fraxinus angustifolia*

I.2.2 Pouvoir des plantes

La croissance et le fonctionnement des êtres vivants, s'effectuent grâce à un ensemble complexe de réactions chimiques appelé métabolisme (**Botineau, 2011**), les plantes renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme, ainsi que le pouvoir d'un remède à base de plantes d'influencer les fonctions du corps humain ce diffère entre les plantes selon la nature et la teneur en ces composants, donc il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elle agissent sur l'organisme. En effet depuis qu'ils ont commencé à extraire et isoler les substances chimiques des plantes et le considéré en fonction de leurs principes Actifs (**Iserin, 2001 ; Hartmann, 2007**).

I.3 Principes actifs et propriétés thérapeutiques de *Fraxinus angustifolia*

Les plantes produisent un vaste groupe de composés organiques, il n'y a pas très longtemps on ne connaissait pas le rôle de ces composés, qui sont produits directement lors de la photosynthèse avec un ensemble de réactions chimiques complexes (**Seghiri, 2013**). En effet en plus des métabolismes primaires (protéines, lipides, glucides et des oligoéléments ...) qui sont indispensables pour le développement et la croissance de la plante, les végétaux accumulent des métabolites dits « secondaires » participant à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs tels que : lumière UV, les insectes nocifs et la variation de la température (**Sarni-manchado et Veronique, 2006**). Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en Alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique, et leur nombre dépasse actuellement 100000 substances identifiées, parmi eux : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes, qui se trouvent dans toutes les parties des plantes mais cette distribution varie d'une plante à l'autre (**Seghiri, 2013**).

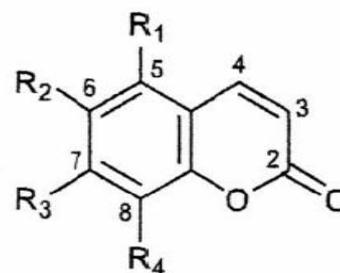
Le frêne est connu et utilisé en médecine traditionnelle depuis les temps les plus anciens. On emploie les feuilles, l'écorce, et les semences (**Beloued, 1998**) qui constituent une source importante des produits naturels est principalement par la présence de coumarines (esculelin, esculine, cichariin, scopoletin, isoscopoletin, fraxine, fraxinol, fraxetin) (**Kostova et Iossifova, 2007**) secoiridoids et phenylethanoids, des phénols simples, des lignanes et des flavonoïdes (**Hosny, 1998 ; Beloued, 1998; Jensen et al., 2002 ; Ayouni et al., 2016**).

➤ Les coumarines

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom vernaculaire de la fève tonka (**Bruneton, 1999 ; Booth, 2004**) d'où fut isolée pour la première fois en 1820 par Vogel (**Smyth and al., 2009**) et il s'agit d'un composé à neuf atomes de carbones possédant le noyau benzopyrane 2, qui est le dérivé de l'acide cis-cinnamique oxygéné en C2 (**Booth, 2004 ; Harkati, 2011**). Selon la nature de substitution et la structure les coumarines ont été classées en cinq catégories: coumarines simples, Furanocoumarines, Pyranocoumarines, Dicoumarines, Tricoumarines. Fraxinus est caractérisé par la présence de sept composés de coumarines (Figure 07) (**Iossifova et al., 1997**).

Tableau II : Différents types de coumarines qui existe chez *Fraxinus angustifolia* (**Kostova et Iossifova, 2007**).

Type de coumarine	R1	R2	R3	R4
Esculetin	H	OGlc	OH	H
Esculin	H	OH	OGLc	H
Cichoriin	H	OMe	OH	H
Scopoletine	H	OH	OMe	H
Fraxetine	H	OMe	OH	OH
Fraxine	H	OMe	OH	OGLc
Fraxinol	OMe	OH	OMe	H



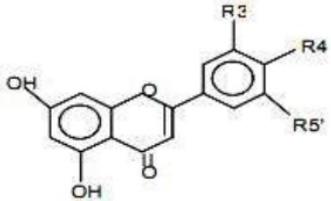
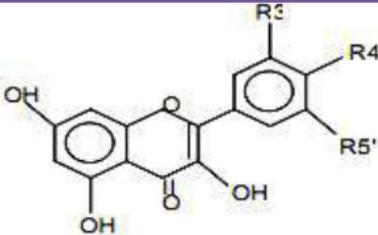
Les coumarines manifestent divers Activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrane, telle que l'Activité antifongique, Anti-tumorale, Anti-inflammatoire, Antivirale, ainsi que une activité inhibitrice de plusieurs enzymes

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes présents dans la plupart des plantes, sont des pigments poly phénoliques qui sont responsables de la coloration des fleurs et les fruits en jaune ou blanc (**Iserin, 2001**). Ils possèdent le même squelette de base (C6-C3-C6) à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycle en C6 (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné que désigne la lettre C (**Bruneton, 1999; Dacosta, 2003; Kone, 2009**), dont la modification (Oxydation, Alkylation, méthylation...) donne les différentes sous classes des flavonoides : les flavones , les flavonols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les flavanes, les flavanols et les anthocyanines (**Brunton, 1999 ;Marais et al., 2006; Veitch et Grayer, 2006**).

Le genre *Fraxinus* est caractérisé par la présence des flavones et des flavonols ainsi que par la quercétine, le kaempférols et leurs glycosides sont souvent présents (Kostova et iossifova, 2007) le tableau III présente les quelques structure des flavonoïdes.

Tableau III : quelques différentes structure des flavonoïdes (Kostova et iossifova, 2007)

Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses vertus médicinales et la principal propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être « veino-actif » c'est-à-dire capables de diminier laperméabilité des capillaires sanguins et de renformer leur résistance (Brunton, 1999 ;Iserin, 2001), ainsi que ils expriment des propriétés antioxydantes (Hodek *et al.*, 2002; Iserin, 2006 ; Boudiaf, 2006), anti-tumorale (Hollmann *et al.*, 1996), anti-bactérienes (Wich et Anton, 2009), analgésiques (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007), anti-inflammatoire, anti-allergique, ainsi que la capacité de stimuler le système immunitaire (Merken et Beecher, 2000).

➤ **Les tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, possèdent une masse comprise entre 500 et 3000 KDa qui en plus de la réactivité usuelle des composés phénoliques ont la capacité de faire précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines (Tarascou, 2005). On distingue deux groupes de tanins :

• Les tanins hydrolysables

Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable de l'acide phénol. Le sucre est généralement le D-glucose et l'acide phénol soit l'acide gallique (gallotanins) ou bien l'acide ellagique (ellagitanins) (Figure 7A) (Rira, 2006).

• Les tanins condensés

Chimiquement définis comme étant des oligomères ou des polymères d'unités flavonoïdes car ils possèdent un squelette comprenant deux cycle aromatique, le cycle (A) et (B) et un hétérocycle oxygéné, le cycle (C) (Figure 7 B), l'oxydation des tanins condensés dans un milieu alcool acide entraîne la formation de pigments Anthocyaniques qui est responsable de la coloration variée des fleurs, des feuilles, et des fruits en rose, rouge, mauve, violet et bleu (Bennick, 2002 ; Hedqvist, 2004).



Figure 7 : Structure chimique (A) des tanins hydrolysables, (B) des tanins condensés

➤ Les secoiridoids

Les secoiridoids sont une classe de métabolites secondaires trouvés dans une grande variété de plante, les plus répandus chez *Fraxinus angustifolia* sont : ligstroside et oleuropein (Hosny et al., 1991); fraxicarboside A [6"-hydroxyoleuropein O-trans-pcoumaroyl-10], fraxicarboside B [[6"-O-trans-caffeoyl-10-hydroxyoleuropein], fraxicarboside C [cétyle de 3''O6"-O-trans-caffeoyl-10 - hydroxyoleuropein], 10-hydroxyoleuropein, 10-hydroxyligstroside (Hosny, 1998 ; Kostova Iossifova, 2006); ligstral, angustifolisides [6"-O-(β-D-glucopyranosyl)-oleuropein] et B [6"-O-(β-D-glucopyranosyl) - ligstroside], nuezhenide, angustifoliside C [6 f-

O-(β -D-glucopyranosyl)-neoleuropein];ligstrobutyl, oleobutyl penta-Omethyl - ligstroside, tetra O methyl-oleoside (Figure 8) (Calis *et al* ,1993) .

Secoiridoids	R 1	R 2
Fraxicarboside A	H	H
Fraxicarboside B	H	OH
Fraxicarboside C	Ac	OH

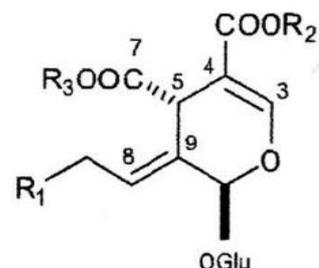


Figure 8 : Structure chimique de quelques secoiridods (Calis *et al.*,1996)

➤ Les phenylpropanoïdes

Le seul trouvé chez *Fraxinus angustifolia* est verbacoside (acteoside) (Figure 9)

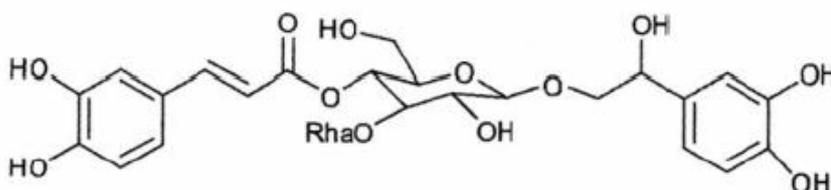


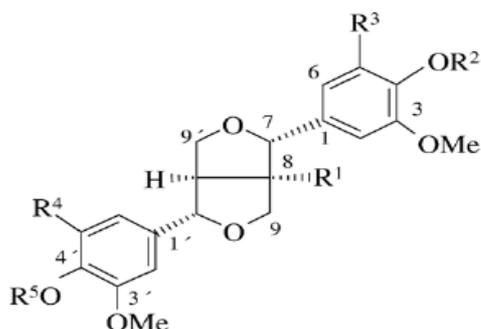
Figure 9 : Structure chimique de Verbacoside (Hosny, 1998).

➤ Les lignanes et les lignines

Le terme de lignane désigne habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8- 8') (Bruneton, 1999).

Il constitue une classe abondante de métabolites secondaires, qui suscitent un intérêt croissant, en raison de leurs activités Biologiques, par exemple : Anti-tumorale, antimitotique et antiviral (Renouard, 2011).

Les lignines sont le résultat d'association de trois unités phénoliques de base dénommée monolignols de caractère hydrophobe. *Fraxinus angustifolia* caractérisé par la présence des lignanes représentés dans la figure (Figure 10)



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

Figure 10 : Structure chimique des lignanes de *Fraxinus angustifolia*

I.4 Source, effets et outils de détection des altérations de matériel génétique

L'ADN est le support universel de l'hérédité contenant l'information génétique des êtres vivants. La transmission conforme du matériel génétique de génération en génération assure le fonctionnement cellulaire des organismes et permet à la cellule de rester réactives aux différents signaux (Watson *et al.*, 2012). L'ADN est une molécule fragile de stabilité chimique limitée qui peut subir des perturbations provoquant ainsi des mutations de plusieurs origines et sources génotoxiques (Benjamin, 1985).

I.4.1 Sources de génotoxiques

Les composés génotoxiques sont par définition des agents physiques ou chimiques capables d'induire des modifications génétiques dans la cellule vivante de manière directe ou indirecte (par l'intermédiaire de métabolites) (Wargler et Kramers, 1992). Les dommages à l'ADN peuvent avoir plusieurs origines (Figure 11).

I.4.1.1 Agents physiques**▪ RAYONNEMENT NON IONISANTES**

La lumière ultraviolette comprise entre 200 et 300nm et qui correspondent aux maximums d'absorption des acides nucléiques induits de nombreux photoproduits dans l'ADN(**Russel, 1980**), qui sont à l'origine de (liaisons covalentes).Deux lésions différentes qui relient des pyrimidines adjacentes (T, C) dans le même brin à l'origine des lésions mutagènes voir même très létales. La transition C→T est la mutation la plus fréquente, mais d'autres substitutions de bases (transvasions) et décalage de cadre de lecture sont également induits par la lumière UV (**Griffiths et al., 2002**).

▪ Radiation ionisantes

Un rayonnement ionisant (rayon X et rayons γ) est une onde électromagnétique qui lorsque elle traverse un milieu biologique ; des électrons sont éjectés des atomes des molécules rencontrée, en effet des molécules et des atomes stables sont alors transformés en radicaux libres et en ions réactifs (**Klug et al., 2006**). Les radiations ionisantes peuvent rompre la liaisons(N)-glycosidique, conduisant ainsi a la formation des sites apurinique (AP) et peuvent également provoquer la cassure des brins, ce qui représente la majorité des effets létaux de ces radiations (**Lints, 1991**).

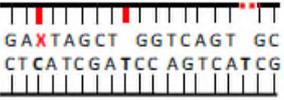
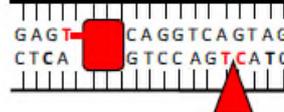
Dommages à l'ADN engendré par		Type de lésions	Processus de réparation
ROS Radiation ionisantes Agents alkylants	 <p>G X TAGCT GGTCAGT GC CTCATCGATCC AGTCATCG</p>	Modification de base Site abasique Cassure simple brin	Réparation par excision de base BER
UV Sels de platine HAP ROS	 <p>G A G T C G C C T A G G T C T T G C C T C A G C G G A T C C A G A A C G</p>	Lien intra brins Dimère de pyrimidines	Réparation par excision de nucléotides NER
Erreur de réplication	 <p>G A G T G G C T A G G T C A G T G C C T C A T C G A T C C A G T C A T C G</p>	Mauvaise assortiment de base Insertions/Délétions	Réparation des mésappariements MMR
ROS, UV Radiation ionisantes Agents alkylants Sels de platine	 <p>G A G T A G C T A G G T C A A G C C T C A T C G A T C C A G T T C G</p>	Liaisons inter brins Cassure double brins	Réparation recombinatoire NHEJ, HR
Aldéhydes Psoralènes HAP	 <p>G A G T C A G G T C A G T A G C T C A G T C C A G T C A T C</p>	Adduits à l'ADN Intercalation	Réparation par excision

Figure 11 : Principaux types de dommages à l'ADN causés par des agents exogènes ou endogènes, ainsi que les voies de réparations associées (Cécile, 2011).

I.4.1.2 Agents chimiques

- **Les analogues de bases**

Ce sont des composés chimiques qui ressemblent suffisamment aux bases azotées normales, parfois en raison de leur similarité, elles sont incorporées à la place des bases normales, l'exemple le plus courant est celui de 5-Bromouracile, analogue de la thymine, il provoque des transitions de AT→GC (Eberhard, 2003 ; Watson *et al.*, 2012).

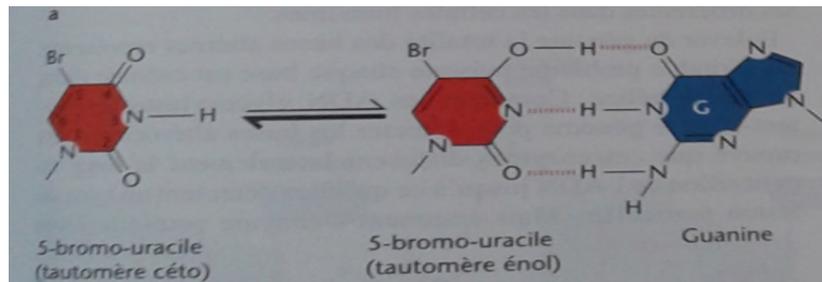


Figure 12 : Exemple d'analogue de base 5bromo-uracile et le mode d'interaction avec la guanine (Watson *et al.*, 2012).

- **Les agents intercalant**

Ce sont des molécules plates, contenant plusieurs anneaux polycycliques qui se lient aux bases puriques et pyrimidiques conduisent l'ADN polymérase à insérer un nucléotide supplémentaire en face de l'agent intercalant provoquent l'addition ou la délétion d'une voire même de plusieurs paires de bases (Benjamin, 1985 ; Moussard, 2010).

- **Les agents de transformation des bases**

L'acide nitreux (HNO₂) est un agent de désamination qui enlève leurs groupements -NH₂ aux bases et les remplacent par des groupements cétones provoquant des mutations ponctuelle inactivantes. L'acide nitreux désamine l'adénine en hypoxanthine, la cytosine en uracile, et la guanine en xanthine, ce qui crée des transitions de AT→GC (Russel, 1980 ; Kruch, 1982).

- **Les agents alkylants**

Ce sont des molécules réactifs capables d'entraîner des méthylations, éthylations ou alkylations au niveau des bases azotés tels que l'éthylméthane sulfonate (EMS) et la nitrosoguanidine (NG) qui ajoutent des groupement alkyle (groupement éthyle dans le cas de l'EMS et un groupement méthyle dans le cas de la NG) en de nombreuses positions des quatre

base (figure 10) et lorsque le groupement Alkyle est ajouté à l'Oxygène en position (6) de la guanine il y aura formation de la O-6-alkylguanine qui conduit à des transitions GC→AT (Samouelian *et al.*, 2009 ; Griffith *et al.*, 2010 ; Watson *et al.*, 2012).

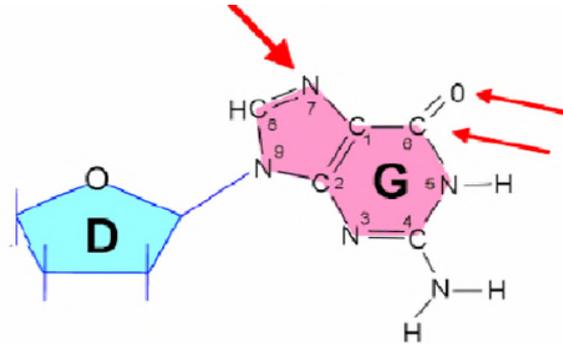


Figure 13: Principaux site d'action des agents alkylants (Badria, 2009).

Les agents alkylants peuvent également modifier les bases de nucléotides entrants (dNTP) ou (N) est n'importe quelle base qui sont les précurseurs au cours de la synthèse d'ADN (Griffith *et al.*, 2010).

I.4.2 Les types de dommages de l'ADN induites par les substances mutagènes

Les génotoxiques sont des molécules qui présentent un effet toxique sur le génome, en particulier une capacité d'altérer le matériel génétique (Figure 14). Ces altérations peuvent être soit directes en induisant une modification de l'ADN (Mutation génique) ou des chromosomes (mutations chromosomiques), soit indirectes comme la modification de la structure des nucléotides avant incorporation dans l'ADN ou l'inhibition des enzymes de synthèse ou de réparation (l'ADN polymérase, ligases, topo isomérase, ...etc.) (Mutation génomiques) (Favelier, 1995)

I.4.2.1 Mutation génique

Dans les mutations géniques ont distingué :

- **Les additions ou délétions de bases** : sont souvent appelées mutations de déphasage (*frameshift mutations*) (**Léonard, 1990**).
- **Les substitutions** : sont de deux types, les transitions et les transversions. Les transitions sont dues au remplacement d'une base purique par une autre base purique, ou au remplacement d'une base pyrimidique par une autre. Les transversions consistent dans le remplacement d'une purique par une pyrimidique ou inversement (**Botta, 2005**).

I.4.2.2 Mutations chromosomiques

Les anomalies chromosomiques se subdivisent en anomalies de nombre (effets aneugènes) et en anomalies de structure (effet clastogènes).

Les aberrations chromosomiques peuvent être chromatiniennes (échanges, cassures,..) ou chromosomiques (affectant les deux chromatides du chromosome : fragments acentrique, dicentriques, translocations,...).

➤ Aberration chromosomique

❖ Anomalies de nombre ou aneugénèse

L'aneugénèse est définie comme la modification de garniture chromosomique et notamment la perte d'un ou de plusieurs chromosomes au cours de la mitose avec comme conséquence la perte d'une partie importante de l'information génétique des cellules descendantes concernées (**Botta, 2005**)

❖ Anomalies de structure ou clastogénéité

Les anomalies de structure concernent l'ensemble des modifications qualitatives des chromosomes, de la structure des chromosomes ; elles surviennent à la suite d'une exposition à un agent clastogènes (**Léonard, 1990**).

➤ Aberration chromatidiques

Les aberrations chromatiques sont celles dans lesquelles l'unité impliquée est la chromatide. Ces anomalies peuvent être relativement simple (lacunes, cassures) ou résulter d'échanges entre des chromatides appartenant à un même chromosome ou à des chromosomes différentes (Léonard, 1990).

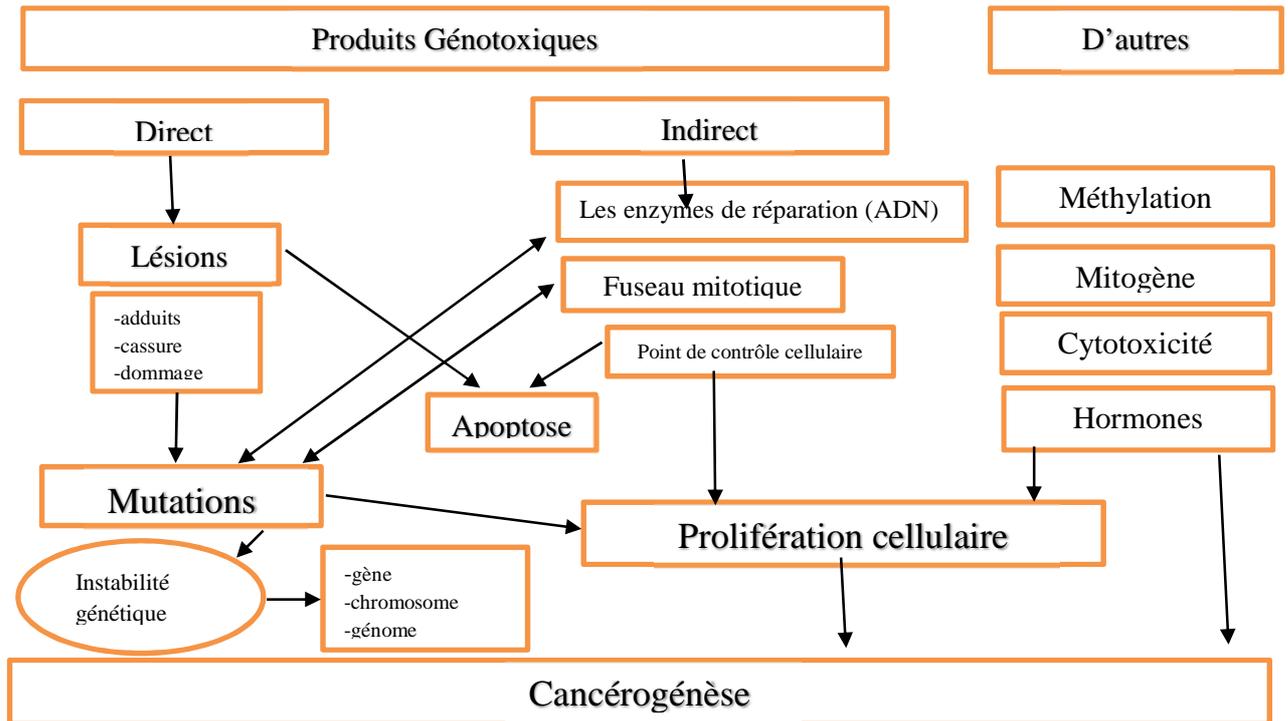


Figure 14 : Les diverses cibles des agents génotoxiques (Darolles, 2010)

Les agents génotoxiques peuvent exercer leur action délétère par interaction directe avec l'ADN, mais également de manière très indirecte, en se liant à des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (par exemple : tubulines, enzymes de réparation de l'ADN, les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, etc.). Les composés non génotoxiques sont également capables d'induire le cancer en augmentant le taux de prolifération cellulaire (mitogènes, par exemple), en changeant le statut de méthylation de l'ADN ou en déclenchant une cytotoxicité. La prolifération cellulaire peut être un effet principal de l'agent cancérogène ou un effet secondaire suite à la toxicité cellulaire. L'apoptose peut être induite par plusieurs types de substances génotoxiques. L'élimination excessive des cellules par apoptose peut induire la prolifération cellulaire compensatrice pour rétablir l'homéostasie. La cancérogénèse est donc le

résultat de l'équilibre entre les mutations, les changements épigénétiques, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire (Darolles., 2010).

I.4.3 Outils de détection des altérations de matériel génétique

Les tests de génotoxicité visent à mettre en évidence l'altération par des composés chimique ou physique du matériel génétique, pouvant conduire si les lésions génotoxiques ne sont pas facilement et correctement réparées par les systèmes enzymatiques adéquats, à des mutations. Ils détecteront donc principalement les lésions de l'ADN et/ou des chromosomes ou ses conséquences (effets phénotypiques de mutation génique).ils ne visent pas à détecter directement des cellules cancéreuses, mais des cellules normales ayant subi une atteinte ou agression génotoxique (Favelier, 1995 ; Hartmann *et al.*, 2004 ;Botta, 2005) .Les tests les plus fréquemment utilisés sont les tests de Ames ; les tests de comètes ; des micronoyaux ;et les tests des aberrations chromosomiques.

I.4.3.1 Test des aberrations chromosomiques

Le test des aberrations chromosomiques, basé sur le fait que la majorité des agents génotoxiques ont des propriétés clastogènes, consiste à étudier les anomalies chromosomiques observées sur les cellules en métaphase après une exposition à des agents mutagènes (Natarajan et Obe, 1984).

I.4.3.2 Test des micronoyaux (MNC)

Les micronoyaux (MNC) proviennent de la chromatine suite aux cassures de chromosomes ou de troubles dans la formation ou le fonctionnement de fuseau mitotique (Lauwerys *et al.*, 2007).

Ce test a l'avantage de détecter en même temps les substances clastogènes et aneugènes (Dauffaud *et al.*, 1984), c'est à la fois un test de mutations chromosomiques et de mutations génomique(Ortega, 2004).

I.4.3.3 Test des comètes (SCGE) :

Le test d'électrophorèse en gel d'agarose de cellule isolées (*Singl cell gel électrophoresis*, SCGE) appelé communément le test des comètes, permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques et réparation des dommages et enfin lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel

que l'apoptose (**Thierry, 2009**). Ainsi, après l'électrophorèse, les noyau dont l'Adn subi des cassures prennent une forme de comète et les noyau dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds. Une évaluation semi quantitative au quantitative des taux de dommages peut ensuite être réalisée (**Ostling et Johanson, 1984**).

I.4.3.4 Test d'Ames

Décrit dans une série de publications au début des années 70 par Bruce Ames et son équipe de l'Université de Californie à Berkeley (**Ames et al., 1973**), le test d'Ames consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium* (**Ames, 1973**). Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation dans un des gènes responsable de la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ reversent spontanément vers His⁺ et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet, en quantifiant l'induction de ces mutations réverses His⁺, de mesurer le potentiel génotoxique de la substance ou préparation étudiée. Plusieurs souches bactériennes de nature génétique différente peuvent être utilisées (**Maron et Ames, 1983**), notamment les souches TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535 et TA1537. Ces souches sont porteuses de mutations His⁻ différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés.

La grande majorité des produits pénétrant dans un organisme humain est détoxifiée afin d'être rapidement éliminée. Ce métabolisme conduit souvent à des espèces chimiques réactives intermédiaires électrophiles, qui sont les formes mutagènes ; le métabolisme ou bioactivation de beaucoup de composés génotoxiques est donc requis pour qu'ils exercent leurs effets délétères (**Guengerich, 2000**). Les systèmes enzymatiques, notamment les cytochromes P-450 qui interviennent dans ces réactions se situent principalement au niveau du foie et exigent des cofacteurs (oxygène et NADPH). Ils sont aussi inductibles. Dans le test d'Ames, ce métabolisme est mimé en mélangeant un homogénat de foie de rat (appelé fraction S9) avec les bactéries et les cofacteurs nécessaires (**Forster et al., 1980**). Un traitement préalable des rats par un inducteur (généralement l'Aroclor 1254) assure la présence de tous les systèmes enzymatiques.

Le test d'Ames consiste dans sa version classique standard à préparer une série de mélanges d'une quantité constante d'une des souches bactérienne et des quantités croissantes du produit à tester et à les étaler sur des boîtes Pétri contenant un milieu minimal. Ce milieu autorise la croissance des mutants His⁺ uniquement. Afin d'augmenter la sensibilité du test, une trace d'histidine est ajoutée qui permet la croissance de 2 à 3 générations de His⁻ et amplifie l'apparition des mutants. Après incubation pendant 48 h, le dénombrement des mutants His⁺ est effectué. Ceux-ci apparaissent sous la forme de colonies sur un tapis cellulaire translucide. Une courbe dose-réponse est tracée en portant en ordonnées le nombre de His⁻/boîte en fonction des doses testées. Le pouvoir mutagène est défini comme la pente de la région ascendante de la courbe (nombre de His⁺/μg ou n mole). Les résultats peuvent être exprimés aussi en nombre de révertants par boîte ; le pouvoir mutagène est avéré s'il y a 2 fois plus de révertants que dans la boîte contrôle (quotient révertants produit testé/révertants boîte contrôle >2).

A côté de la méthode standard, il existe d'autres méthodes, notamment une microméthode en milieu liquide réalisable en plaque 96 puits qui semble plus sensible que la méthode standard (méthode du test d'Ames par fluctuation) (**Bridges, 1980**). Une adaptation du test d'Ames à des souches bactériennes *E. Coli* déficientes en synthèse de tryptophane (souche WP2 -pkM101) a aussi été proposée (**Green et Muriel, 1976**).

L'opéron tryptophane

Un opéron est un groupe de gènes comprenant un opérateur (accepteur de l'enzyme de transcription), un promoteur commun et un ou plusieurs gènes structuraux c'est-à-dire de gènes codant pour des protéines ayant un rôle spécifique dans le développement de la cellule, par opposition aux protéines régulatrices, dont la fonction est de réguler l'expression des autres gènes. Dans le cas de l'opéron tryptophane, il s'agit de cinq gènes adjacents le long de la molécule d'ADN d'*E.coli* : les gènes *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* et *trpA*. Ces gènes codent pour cinq enzymes qui catalysent les réactions de synthèse du tryptophane à partir du chorismate dont le processus est indiqué dans la figure ci dessous. En effet, vu que les bactéries peuvent se développer sur un milieu minimum, elles sont donc capables de synthétiser les vingt acides aminés qui entrent dans la composition des protéines.

Cependant, les bactéries peuvent développer des mécanismes capables de réprimer la synthèse des enzymes nécessaires à la biosynthèse de certains acides aminés lorsque ceux-ci sont disponibles dans le milieu (Bliss, 1979 ; Santillán et Mackey, 2001).

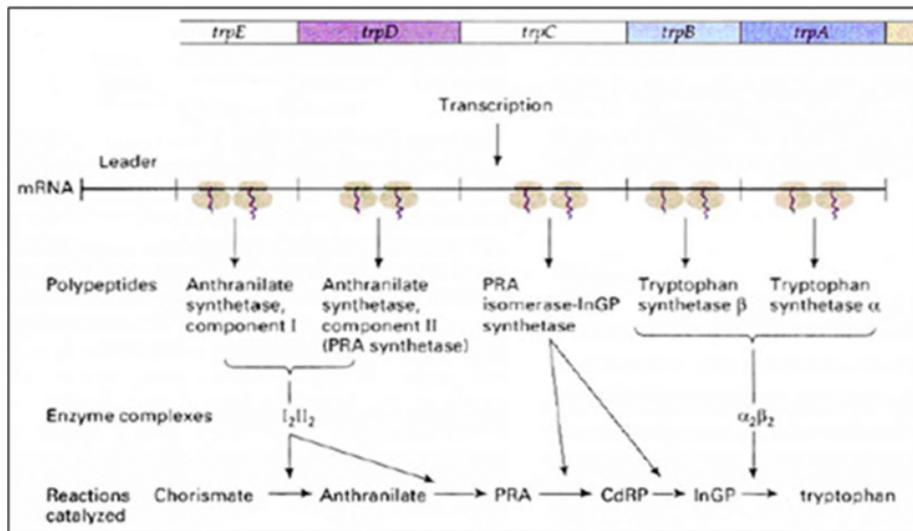


Figure 15: organisation de l'opéron tryptophane (Bliss., 1979).

✚ Régulation de l'opéron tryptophane

Avant d'expliquer le fonctionnement de la régulation négative de l'opéron tryptophane, nous revenons sur le processus de transcription. Le processus de transcription se fait grâce à un enzyme, l'ARN-polymérase, qui détecte un site particulier, appelée promoteur, qui consiste en une séquence spécifique de paires de base qui est située avant le début de la séquence propre du gène. La spécificité de la séquence du promoteur est de présenter une affinité plus ou moins forte avec la polymérase, permettant ainsi de la fixer au début du gène, de manière à commencer la transcription. De manière analogue, il existe un site appelé terminateur situé juste après le gène, qui donne à l'enzyme le signal de fin de transcription. Dans le cas de l'opéron tryptophane, les cinq gènes structurels étant adjacents, il n'y a qu'un seul promoteur, située avant le gène *trpE* et un seul site terminateur, après le gène *trpA*. La phase de transcription est donc unique pour les cinq gènes : une seule molécule d'ARN est construite ; puis elle est séparée pour permettre de produire les cinq protéines. Le fait que les gènes ayant des fonctions connexes soient regroupés dans une même unité de transcription représente un avantage important : ils forment un ensemble

qui peut être commandé par un seul ‘interrupteur’. L’interrupteur en question est un segment d’ADN appelé opérateur (Sinha, 1988 ; Santillán et Mackey, 2001 ; Bhartiya, 2003).

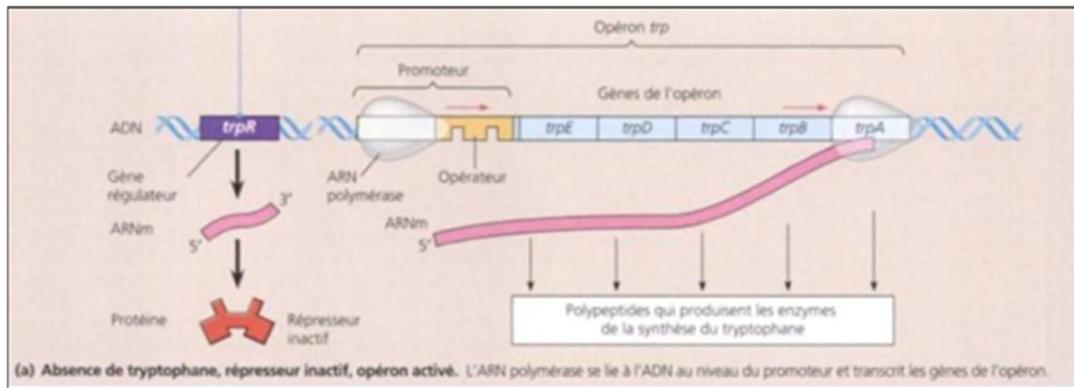


Figure 16: Représentation schématique de la régulation de l’opéron Tryptophane (Santillán et Mackey, 2001).

À l’état naturel L’ARN polymérase peut se lier au promoteur et transcrire les gènes de l’opéron. Mais l’opéron peut être inactivé par une protéine appelée répresseur qui se lie à l’opérateur et empêche l’ARN polymérase de se fixer au promoteur. Le répresseur est le produit d’un gène appelé gène régulateur. Le gène régulateur *trpR*, qui code pour le répresseur de *trp*, Dans ce processus, le tryptophane joue le rôle de corépresseur. Un corépresseur est une petite molécule qui agit conjointement avec un répresseur protéique pour désactiver un opéron. Lorsque la concentration de tryptophane augmente, un nombre croissant de molécule de cette substance se lie aux molécules de répresseur ; l’une de celle-ci peut alors se fixer à l’opérateur *trp* et inactiver la production du tryptophane. Lorsque la concentration de tryptophane diminue, la transcription des gènes de l’opéron reprend. Et ce processus décrit plus haut porte le nom de **rétroaction négative**. L’adjectif “négatif” vient du fait que le rôle de la molécule régulatrice est un rôle inhibiteur (Sinha, 1988 ; Santillán et Mackey, 2001).

I.4.3.5 SOS chromotest

Ce test est basé sur la mise en œuvre du système SOS activé chez les bactéries suite aux dommages à l’ADN (Quillardet *et al.*, 1982). Ce test détecte donc indirectement ces dommages à l’ADN. La lecture se fait grâce à la mise en évidence d’une activité b-galactosidase artificiellement couplée à l’induction de la réponse SOS dans la souche bactérienne utilisée (E Coli). Ce test est réalisable en microméthode (plaque 96 puits). Il est notamment applicable aux

extraits de sol, sédiments, à l'eau et à l'atmosphère (Bian *et al.*, 2004; Jolibois et Guerbet, 2006; Skarek *et al.*, 2007).

❖ Le système de réparation SOS

C'est un mécanisme de réponse permettant l'adaptation et l'évaluation de la bactérie quand les conditions l'exigent. L'exposition des cellules de E-coli à des agents mutagènes physiques, chimiques ou à des conditions qui endommagent et/ou interfèrent avec la réplication de l'ADN induit une série de réponses SOS (Radman, 1974 ; Matic, 1995).

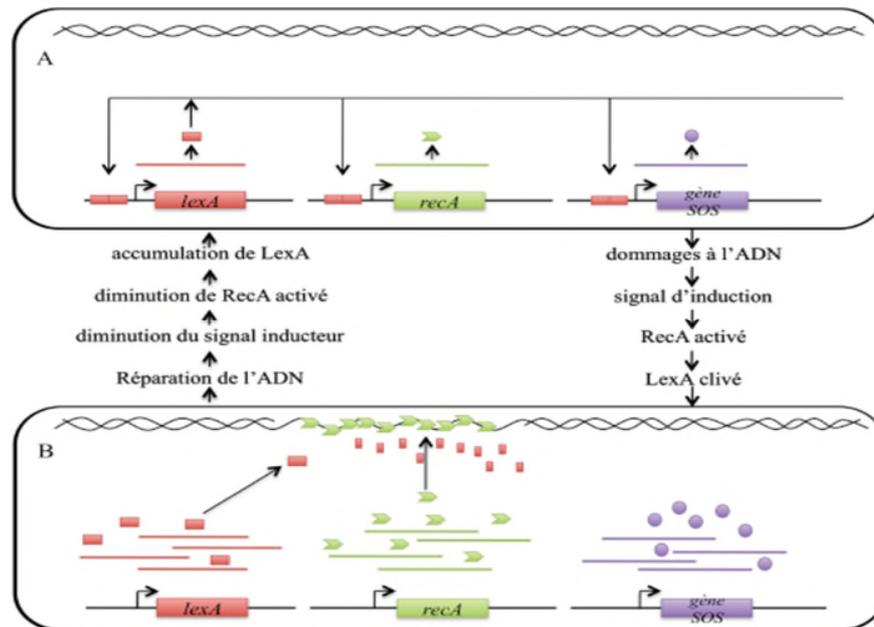


Figure 17 : Représentation de système de réparation SOS (Guerin., 2010)

A l'Etat non induit : la bactérie ne subit aucun dommage (ADN intact) LexA réprime l'expression des gènes du régulon SOS. Ces gènes expriment un faible taux de protéines, de cette façon RecA est présent de façon constitutive dans la bactérie non induite. B. Etat induit : après la formation d'ADN endommagé (ADNsb), l'activité co-protéase de RecA est activée par liaison à l'ADN simple brin. L'interaction avec la protéine LexA conduit à l'autoprotéolyse de LexA l'empêchant ainsi d'exercer son rôle de répresseur. Les gènes qui étaient sous contrôle de LexA sont déréprimés, cependant leur cinétique d'expression peut ne pas être la même certains gènes étant plus fortement réprimés que d'autres. Quand le signal inducteur disparaît (réparation des lésions de l'ADN), le taux de RecA décroît, LexA s'accumule et rétablit la répression sur les gènes SOS. D'après (Guerin., 2010).

II.1 Matériel

II.1.1 Matériels et Produits chimiques

- Rotavapor (Heidolph, Germany), Bain Marie, incubateur (Mettler), Spectrophotomètre (Shimadzu, Japon), Compteur de colonie (Stuart).
- Ethanol et Diméthylsulfoxyde (prolab) ; 2-aminofluorane, Aroclor 1254, Glucose 6 phosphate (Sigma Aldrich) et NADP : β -nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate disodium salt (Fluka)

II.1.2 Matériel Végétal

II.1.2.1 *Fraxinus angustifolia*

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est une espèce locale de frêne, dont le nom scientifique est : *Fraxinus angustifolia*. L'étude est portée sur les feuilles et l'écorce qui sont très utilisées en médecine traditionnelle notamment dans le traitement de la constipation, l'œdème, la goutte, l'arthrite et les douleurs rhumatismales (**Beloued, 2009 ; Lucienne, 2013**). Les feuilles prennent une longueur entre 15 à 25 cm, glabre de 5 à 13 feuilles (Figure 18A), l'écorce est de couleur gris profondément cannelé à un âge plus avancé (Figure 18 B)



Figure 18: Photographies de l'écorce (A) et des feuilles (B) de *Fraxinus angustifolia*

✚ **Position dans la systématique d'après Moulaoui *et al.*, (2015)**

***Règne** : végétal ***Embranchement** : Spermaphytes ***Sous-embranchement**: Angiospermes ***Classe**: Dicotylédones ***Sous-classe** : Astéridées ***Ordre** : Lamiales ***Famille** : Oléacées ***Genre** : *Fraxinus* ***Espèce** : *Fraxinus angustifolia*

II.1.3 Les animaux de laboratoire

Pour que les bactéries soient exposées à la substance d'essai en présence et en absence d'un système d'activation métabolique approprié. Nous avons utilisé des rats males, albinos, dont le poids varie de 180 à 250g. Ces animaux ont été obtenus de l'institut Pasteur d'Alger. Pour respecter leur cycle biologique, les animaux ont été mis sous des conditions de température ambiante de (25°C). Ils sont logés dans des cages, avec accès libre de nourriture, à base de maïs et de soja et à l'eau de robinet. Ils subissent un rythme d'éclairage nocturne et d'obscurité 12h/12h diurne.

II.1.4 Le matériel Bactérien

La souche *Escherichia coli* WP2 (pKM101) a été obtenue du laboratoire de Toxicologie université de bourgogne (France), la souche a été stockée à -80°C jusqu'à l'utilisation.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation des échantillons de *Fraxinus angustifolia*

Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en juillet 2014 à Chemini (wilaya de Bejaia), séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière vive (Figure 19). Le matériel végétal sec a été réduit en poudre par broyage, suivi d'un tamisage jusqu'à l'obtention de poudres très fines (diamètre inférieur à 63µm).



Figure 19 : Des feuilles (A) et de l'écorce (B) de *Fraxinus angustifolia* après séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière.

II.2.3 Extraction

Les poudres fines des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été macérées dans l'éthanol 96% avec un rapport masse / volume de 1 : 4 (P : v) pendant 24 h. Par la suite, une décantation de 24 h, suivie d'une centrifugation de 1500 rpm pendant 10 min, donnant naissance à deux phases bien distinctes dont le surnageant récupéré et séché à l'aide d'un rota-vapeur (Heidolph) représente l'extrait éthanolique (Atmani *et al.*, 2009)



Figure 20 : A : Macération

B : décantation

C : Séchage avec rota- vapeur

II.2.3 Test de génotoxicité

Le protocole que nous avons suivi est celui décrits par Maron et Ames (1983), Ames *et al* (1975) pour évaluer la mutagénicité d'une substance chimique, avec quelques modifications portée par Green et Muriel (1984).

A l'inverse des souches de *Salmonella typhimurium* qui possèdent différents sites de mutation au niveau de l'opéron histidine, les souches d'*Escherichia coli* possèdent le même site de mutation au niveau de l'opéron tryptophane (trp E65) avec une sensibilité de détection de mutagène similaire à celle de la souche *Salmonella typhimurium* TA 102, qui porte la mutation His G428 et qui sont généralement très employées pour la détection des mutagènes oxydants (Watanabe *et al.*, 1998 ; Martinez *et al.*, 2000 ; Mortelmans et Riccio, 2000)

Au cours de cette étude, les essais ont été réalisés sur la souche *E. coli* WP2 (pKM101) pour évaluer la mutagénicité / l'antimutagénicité de l'extrait brut des feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

II.2.3.1 Contrôle du génotype d'*Escherichia coli* WP2 (pKM101)

Pour confirmer le génotype d'*E. coli* WP2 (pKM101) on a suivi un protocole qui étudie les mêmes caractéristiques avec Salmonella essai (Maron et Ames, 1983) et qui est présenté dans le (Tableau IV).

Tableau IV: Tableau représentant les caractéristiques de la souche *E.coli* WP2 (pKM101).

Souche	Mutation	Effet de la mutation	Présence	Absence
<i>E.coli</i> WP2 (pKM101)	TrpE 65	tryp-	+	
	<i>uvrA</i>	augmentation de la sensibilité aux UV		+
	<i>rfa</i>	augmentation de la perméabilité membranaire	+	
	pKM101	Présence des gènes mucA, résistance à l'Ampicilline	+	

✓ Marqueur de tryptophane

Afin de confirmer le caractère auxotrophe d' *E. coli* WP2 (pKM101) au tryptophane (trp-), 100µl de tryptophane (0,05 mM) ont été appliqués au râteau sur la surface des boîtes Pétri contenant le milieu minimum , laissés sécher 20 à 30 min, puis les bactéries ont étéensemencées en stries , et incubé à 37 °C pendant 48 h.

✓ La sensibilité aux UV

Un ensemencement en stries d'*E.coli* WP2 (pKM101) sur des boîtes Pétri contenant de la gélose nutritive agar, les boîtes ont été à moitié couvertes du papier aluminium stérile et exposées à une lampe UV pendant 12 s, puis incubées à 37°C pendant 24 (Figure 21).



Figure 21 : L'exposition des boîtes aux UV pendant 12 S.

✓ **Présence du marqueur de résistance à l'ampicilline et mutation *rfa***

2,5 ml de top agar additionné de tryptophane 0,05 mM et 100 µl de la souche bactérienne, puis homogénéisé et versés sur la surface des boîtes de la gélose nutritive agar. Après séchage, deux disques ont été déposés sur la surface des boîtes, l'un contenant de 10 µl de l'Ampicilline à 8 mg/ml et l'autre 10 µl de Cristal Violet à 1mg/ml respectivement, puis incubées à 37°C pendant 48 h (Figure 22).



Figure 22: Le contrôle de la résistance à l'Ampicilline et la mutation *rfa*.

✓ **Révertants spontanées**

Dans un tube à essai stérile, 2,5 ml de top agar additionné de tryptophane 0,05 mM et 100 µl de l'inoculum bactérien. Le mélange obtenu a été homogénéisé et versé dans les boîtes de Pétri contenant le milieu minimum, ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 72h. Sachant que le nombre de colonies pour cette souche varie entre 35 et 160 révertants par boîte (Wilcox *et al.*, 1999).

II.2.3.2 Système d'activation métabolique

- **Préparation de la fraction S9** Des rats mâles pesant 200g ont été injectés d'un inducteur Aroclor 1254 (500mg/kg) 5 jours avant le sacrifice (Figure 23).



Figure 23 : L'injection de l'inducteur Aroclor 1254



Figure 24 : Quelques étapes de préparation de la fraction S9

Au 5^{ème} jour de l'induction les rats ont été maintenus dans le chloroforme 2 à 3 min après sacrifiés par dislocation cervicale. Le foie est récupéré, pesé et rincé plusieurs fois dans la solution KCl (0,15 M) afin d'éliminer toute trace d'hémoglobine qui pourrait inhiber l'activité de l'enzyme cytochrome P450 (Maron et Ames, 1983).

Le foie est homogénéisé dans le KCl (3 ml / g foie), l'homogénat récupéré est centrifugé pendant 10 min à 9000 g à 4°C, et le surnageant (fraction S9) est aliquote et stocké à -80°C jusqu'à utilisation, toutes les étapes ont été réalisées entre 0-4°C dans des conditions d'asepsie (Maron et Ames, 1983).

➤ Préparation de S9 mix

Le S9 mix pour le test d'Ames est composée de la fraction S9 (10%) additionnée à une solution de cofacteur stérilisée à l'aide d'un filtre (0,45µm) MgCl₂-6H₂O (32,5 mM), Tampon phosphate (0,2 M à pH=7,4), Glucose-6-phosphate (1M), et NADP (0,1M) (Maron et Ames, 1983).

Après que le contrôle du génotype de la souche *Escherichia coli* WP2 (pKM101) est confirmé, nous avons entrepris le test d'évaluation de la mutagenicité / anti mutagenicité des extraits éthanoliques (feuilles et écorce) de *Fraxinus angustifolia* sur la souche avec et sans activation métabolique (S9).

II.2.3.3 Test de Mutagénicité / Antimutagénicité

Notre méthode d'étude s'accorde avec celle **Maron et Ames (1983)**, et **Mortelmans (2000)**.

Différentes concentrations des extraits éthanoliques des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* (50, 100, 200, 400, 800, 100 µg/ml) ont été évaluées pour leur pouvoir mutagène par la méthode d'incorporation directe, et par la méthode de pré-incubation pour leur pouvoir antimutagénique en présence et en absence de l'activation métabolique (S9).

Les différentes dilutions des mutagènes: MMS 8µg/ml, 16µg/ml sans activation métabolique; 2AF 40µg/ml, 80µg/ml avec activation métabolique ont été préparé (**Di sotto et al., 2012**).

- **Test de Mutagénicité**

- **Procédure Expérimentale**

Préparation de l'inoculum : 10 ml d'une culture de bouillon nutritif contenant 100 µl de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) et 200 µl d'ampicilline 8mg/ml ont été incubées dans un incubateur à 37°C pendant 15-16 h pour atteindre une concentration approximativement 2×10^9 bactérie/ml.

Le top agar a été reparti dans des tubes en verre stériles et maintenus entre 43-48°C. Au 2,5ml de top agar 100µl de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) ont été rajouté, 100µl Na Cl 0,9% pour le contrôle négatif, mutagène pour le contrôle positif ou extrait *F.angustifolia*, 500 µl de la solution tampon 0,1M pour le test sans activation métabolique (-S9), ou 500µl de S9 mix en présence d'activation métabolique (+S9). Le contenu des tubes à essai sont homogénéisé (vortex) et versé sur des boîtes Pétri de milieu minimum, laissé sécher de 2 à 3 minutes, puis inversés et placés dans un incubateur à 37°C pendant 48 h. Le nombre des révertants spontanés ont été dénombrés à l'aide d'un compteur de colonies de la marque (Stuart). Le rapport de mutagénicité (RM) a été calculé par la formule suivante : $RM = \text{Nombre de révertants} / \text{Contrôle négatif}$. Si le $RM > 2$, la substance chimique où l'extrait de plante est mutagène.

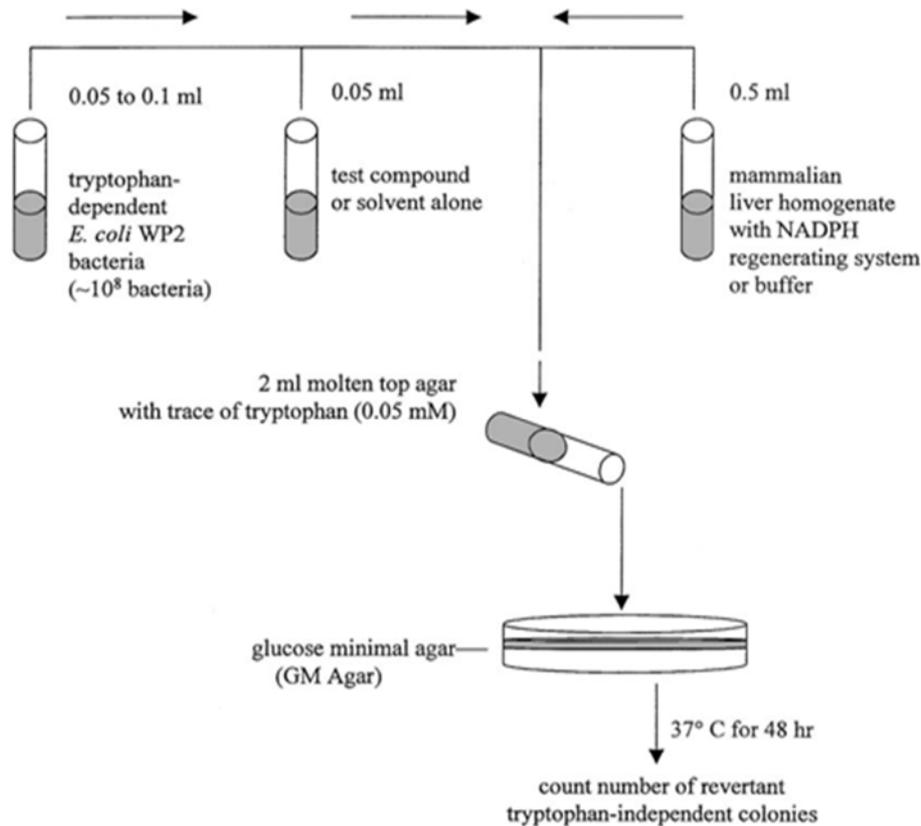


Figure 25 : Présentation schématique du test de mutagénicité par la méthode d'incorporation d'*E. coli* WP2 (pKM101)

- **Test d'antimutagénicité**

Cet essai a été effectué par la méthode de pré-incubation. Cette méthode est basée sur le mélange de l'extrait et le mutagène au même temps et l'incubé à 37°C pendant 30 min.

➤ **Procédure Expérimentale**

La souche *E. coli* WP2 (pKM101) a été pré-incubée à 37°C pour une durée de 30 min en association avec 100 µl de mutagène et d'extrait, et 500 µl du mélange S9 pour le test +S9, 500 µl de la solution tampon de phosphate 0.1 M pour le test - S9. Après la pré-incubation, 2,5 ml de top agar a été ajouté à chaque tube. Ce mélange a été homogénéisé puis versé sur des boîtes Pétri de milieu minimum. Incubés à 37°C pendant 48 h. Le nombre de révertant spontané a été dénombré à l'aide d'un compteur de colonies (Stuart).

Le pourcentage d'antimutagénicité a été calculé par la formule suivante : % d'Antimutagénicité = $100 - [(T / M) * 100]$, avec T: nombre de révertants par boîte en présence de mutagène et l'extrait au même temps et M : nombre de révertants en présence juste de mutagène.

Selon **Negi et al., (2003)** l'effet d'antimutagénicité a été considéré moyenne quand l'effet inhibiteur des composés d'essai était dans la gamme **25-40%**, et fort quand l'effet inhibiteur était plus haut que **40%**. Quand l'effet inhibiteur était inférieur à 25%, ceci a été considéré faible et comme résultat négatif. (**Di Sotto et al., 2012**)

II.3 Analyse statistique

Tous les résultats sont la moyenne \pm SD (n=2). les résultats obtenus ont été analysée en utilisant logiciel Graph-Pad Prism (version 5.3).

III.1 Résultats

III.1.1 Résultats de l'extraction

Le but de l'extraction éthanolique est d'obtenir un maximum de composés actifs, particulièrement phénolique, le rendement en extraction éthanolique sec est de $\approx 12\%$ à partir des feuilles et $\approx 5\%$ à partir de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

III.1.2 Résultats de contrôle du génotype d'*E. Coli* WP2 (pKM101)

- Marqueur de tryptophane

Après incubation à 37°C , une croissance bactérienne a été observée. (Figure 26)

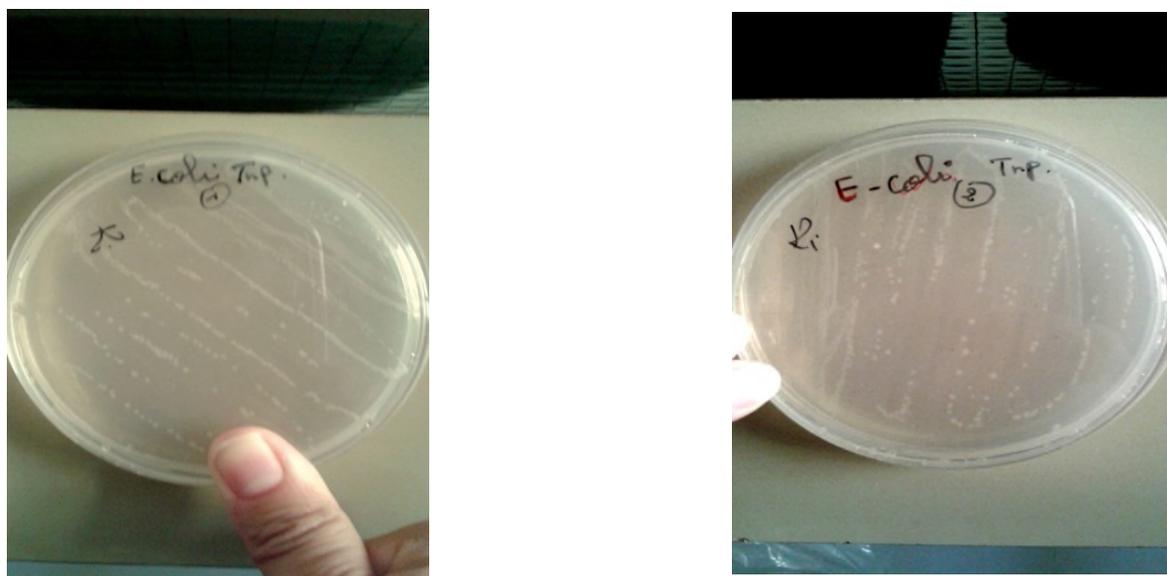


Figure 26 : Photographie de test croissance bactérien *E.coli* WP2 (pKM101) en milieu riche de tryptophane.

- La sensibilité aux UV

L'exposition des boîtes Pétri aux UV n'a induit aucun effet sur la croissance des bactéries, ce qui confirme la résistance de la souche *E. coli* WP2 (pKM101) aux UV et l'absence de la mutation *uvrA* (Figure 27).

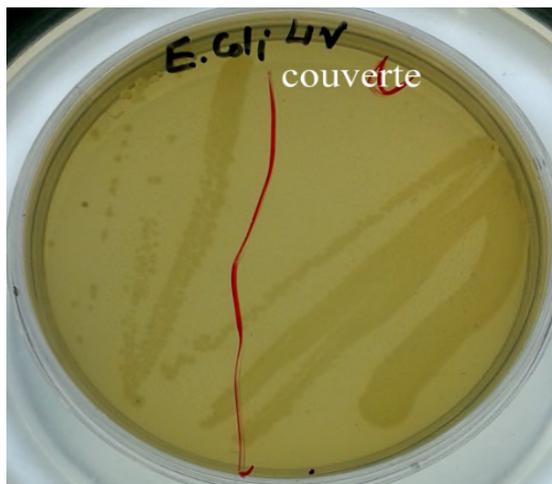


Figure 27 : Résultat d'exposition de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) aux UV

- **Présence du marqueur de résistance à l'ampicilline et mutation *rfa***

Après incubation à 37°C pendant 48h les boites ont été observées : la résistance à l'Ampicilline a été démontrée par la croissance bactérienne autour de disque de cet antibiotique, et la sensibilité au Cristal Violet a été démontrée par inhibition de la croissance bactérienne, qui traduit par la présence d'une zone d'inhibition autour de disque de Cristal Violet. (Figure 28)

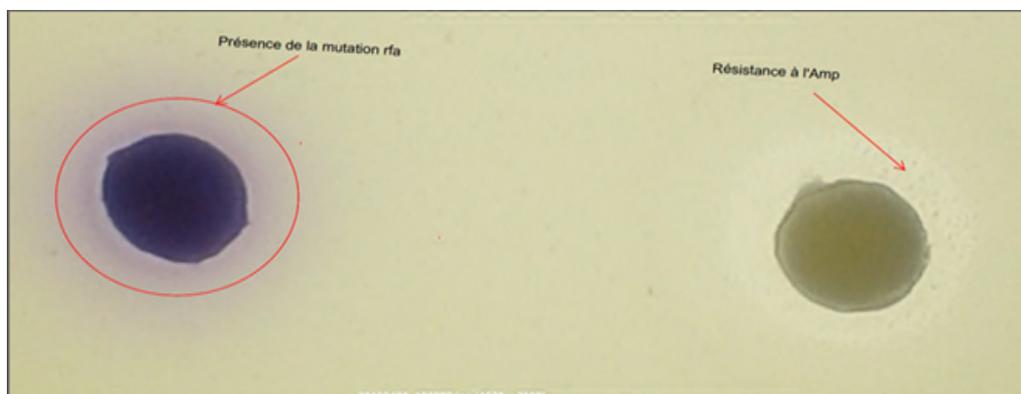


Figure 28 : Présentation de la mutation *rfa* et la résistance à l'Ampicilline

- **Les révertants spontanés**

Après incubation de 72 h à 37°C et quantification des colonies, le nombre de colonie variée d'une valeur minimal de 123 a une valeur maximale de 140 révertants spontanés par boite.

III.1.3 Résultats du test de mutagénicité et d'antimutagénicité

III.1.3.1 Résultats du test de mutagénicité

Les résultats du test de mutagénicité par la méthode d'incorporation directe sur la souche *E. coli* WP2 (pKM101) avec et sans activation métabolique, ainsi que du contrôle Positive au mutagènes (2AF / MMS) avec les concentrations (MMS= 8, 16µg/ml / 2AF= 40, 80 µg/ml), et le contrôle négative (véhicule) sont présentés dans les tableaux V et VI.

Tableau V : Résultats du test de mutagénicité sans S9 sur la souche *E.coli* WP2 (pKM101)

Traitement	Dose µg/ml	Mutagénicité Sans S9	
		Nbr de révertants	Rapport de mutagénicité
CN	0	132±12,02	-
CP(MMS)	8µg/ml	342±40,3	2,6
	16µg/ml	416±6,36	3,2
FF	50µg/ml	94±11,02	0,7
	100µg/ml	114±22,62	0,87
	200µg/ml	145±17,68	1,1
	400µg/ml	166,5±38,18	1,26
	800µg/ml	127,5±9,9	0,97
	1000µg/ml	94,5±52,32	0,7
FE	50µg/ml	126,5±12,02	0,96
	100µg/ml	158±19,8	1,19
	200µg/ml	159,5±38,54	1,2
	400µg/ml	120,5±71,4	0,9
	800µg/ml	111,25±14,5	0,8
	1000µg/ml	82,25±3,18	0,6

CN : contrôle négatif, CP : contrôle positif, ± écart-type n=2 moyenne de deux expériences, FF : Fraxinus feuille, FE : Fraxinus écorce, MMS : méthyle méthane sulfonâtes.

Tableau VI : Résultats du test de mutagénéicité avec S9 sur *E.coli* WP2 (pKM101).

Traitement	doses µg/ml	Mutagénéicité Avec S9	
		Nbr de révertants	Rapport de mutagénéicité
CN	0	119,5±7,8	-
CP (2AF)	40µg/ml	297±15,4	2,49
	80µg/ml	409,5±47,4	3,43
FF	50µg/ml	101±4,25	0,85
	100µg/ml	187,5±67,2	1,75
	200µg/ml	116,5±30,4	0,97
	400µg/ml	91±26,87	0,76
	800µg/ml	82±25,4	0,69
	1000µg/ml	75±21,2	0,63
FE	50µg/ml	141,5±26,16	1,18
	100µg/ml	186,5±27,6	1,56
	200µg/ml	107,5±19,08	0,9
	400µg/ml	87,5±13,45	0,73
	800µg/ml	73±15,56	0,61
	1000µg/ml	35±7,06	0,29

CN : contrôle négatif, CP : contrôle positif, ± écart-type SD n=2 moyenne de deux expériences, FF : *Fraxinus* feuille FE : *Fraxinus* écorce, MMS : méthyle méthane sulfonâtes.

Les résultats des moyennes des révertants spontanés pour le contrôle négatif (véhicule) ont été trouvés : 119,5 et 132 en présence et en absence de l'activation métabolique.

Alors que le traitement de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) par les mutagènes (2AF / MMS) avec les concentrations : MMS= 8, 16 µg/ml / 2AF = 40, 80µg/ml, en présence et en absence d'une activation métabolique reflète un nombre très significatifs ($P^{***} < 0,0001$) de révertants tryptophane (trp - → trp +) par rapport au contrôle négatif, avec rapport de mutagénicité (RM) > 2 [RM (MMS) = 2,6 et 3,2]. [RM (2AF) = 2,49 et 3,43].

Le traitement de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) par les extraits éthanoliques des feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* (par la méthode d'incorporation directe) en présence et en absence d'une activation métabolique avec les concentrations : 50, 100, 200, 400, 800, 1000 µg/ml n'ont pas révélé d'activité mutagène avec un rapport de mutagénicité inférieure < 2. Ainsi que on a remarqué une diminution de rapport de mutagénicité à partir de la dose 200 µg/ml à 1000 µg/ml pour les deux extraits

III.1.3.2 Résultats du test d'antimutagénicité

Pour le test d'antimutagénicité trois concentrations (50,100, 200µg/ml) des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été sélectionnés car aucun effet cytotoxique ni mutagénique n'a été observé lors du test de mutagénicité.

Les extraits de *F. angustifolia* ont été examinés sur la souche *E.coli* WP2 (pKM101) pour évaluer leur activité antimutagénique contre les agents mutagènes : méthyle méthane sulfonâtes (MMS : 8,16µg/ml) et 2-aminofluorène (2AF :40,80µg/ml) en absence et en présence de métabolisme d'activation S9 respectivement.

Les différents résultats de ce test sont présentés dans les tableaux VII et VIII.

- Antimutagénicité sans S9

Tableau VII : Résultats du test d'antimutagénicité sans activation métabolique S9

Traitement	Doses µg/ml	Antimutagénicité sans S9		
		Nbr de révertants	RM	% d'inhibition
CN	0	104,25±4,77	-	
CP (MMS)	8µg/ml	224,33±18,09	2,57	
	16µg/ml	343,5±22,45	3,63	
FF+8µg/ml	50µg/ml	186,25±1,23	1,79	16,97
	100µg/ml	152±12,02	1,47	32,25
	200µg/ml	148,5±27,22	1,46	33,85
FF+16µg/ml	50µg/ml	153,25±19,98	1,49	55,3
	100µg/ml	163,75±7,6	1,58	52,3
	200µg/ml	138±2,47	1,33	46,72
FE+8µg/ml	50µg/ml	87,75±8,3	0,84	60,9
	100µg/ml	69,75±4,77	0,66	68,9
	200µg/ml	99,75±0,88	0,96	55,53
FE+16µg/ml	50µg/ml	111±10,60	1,07	67,7
	100µg/ml	111,5±19,09	1,09	67,5
	200µg/ml	113,5±6,36	1,04	67

CN : contrôle négatif, CP : contrôle positif, ± écart-type SD n=2 moyenne de deux expériences, FF : *Fraxinus* feuille FE : *Fraxinus* écorce, MMS : méthyle méthane sulfonâtes, RM : rapport de mutagénicité

Pour le contrôle positif : le mutagène MMS aux concentrations 8, 16 µg/ml présente un effet mutagénique très significatif ($p^{***} < 0001$) avec un RM=2,57 et 3.63, respectivement.

A la concentration la plus faible de MMS 8µg/ml, l'extrait des feuilles de *F.angustifolia* présente un pourcentage d'inhibition qui varie entre (16,97-33,85%), ce qui traduit par un effet antimutagénique moyen <40% .Ainsi, la même concentration de MMS

avec l'extrait d'écorce a donné un pourcentage d'inhibition varie entre (60,9-55,53%), ce qui traduit par une activité antimutagénique significative ($p^{**} < 0,01$).

Cependant, l'extrait testé à la concentration 16 μ g/ml de MMS, présente une diminution de l'activité antimutagénique pour les deux extraits, effet dose indépendante.

- **Antimutagénicité avec S9**

Tableau VIII : Résultats du test d'Antimutagénicité de la souche *E.coli* WP2 (pKM101) avec l'activation métabolique S9.

Traitement	Doses μ g/ml	Antimutagénicité avec S9		
		Nbr de révertants	RM	% d'inhibition
CN		135,5 \pm 3,9	-	
CP (2AF)	40 μ g/ml	306,5 \pm 21,56	2,26	
	80 μ g/ml	432,5 \pm 14,49	3,19	
FF+40μg/ml	50 μ g/ml	125 \pm 46,35	0,92	59,22
	100 μ g/ml	93,5 \pm 8,13	0,69	69,49
	200 μ g/ml	127 \pm 20,5	0,94	58,56
FF+80μg/ml	50 μ g/ml	133 \pm 14,14	0,98	69,25
	100 μ g/ml	164,5 \pm 14,5	1,21	61,97
	200 μ g/ml	179,5 \pm 17,32	1,32	58,5
FE+40μg/ml	50 μ g/ml	186 \pm 0	1,37	39,31
	100 μ g/ml	167 \pm 0	1,23	45,51
	200 μ g/ml	197 \pm 0	1,45	35,73
FE+80μg/ml	50 μ g/ml	197 \pm 0	1,45	54,45
	100 μ g/ml	267 \pm 0	1,97	38,27
	200 μ g/ml	255 \pm 0	1,88	41,04

CN : contrôle négatif, CP : contrôle positif, \pm écart-type SD n=2 moyenne de deux expériences, FF : *Fraxinus* feuille FE : *Fraxinus* écorce ,2AF : 2-aminofluorène, RM : rapport de mutagénicité

Les résultats de contrôle positif avec le mutagène 2-AF aux concentrations 40, 80 µg/ml (tableau VIII) montre que le mutagène (2 AF) exerce un effet mutagénique très significatif ($p^{***} < 0.0001$) avec un rapport de mutagénicité = 2,26 et 3.19 respectivement.

Tandis que les résultats en présence d'activation métabolique S9, les deux concentrations de 2-AF à 40,80 µg/ml avec l'extrait éthanolique des feuilles de *F.angustifolia* présentent un pourcentage d'inhibition antimutagénique varie entre (58,5-69,49%) et (58,5-69,25%) respectivement, qui ce traduit par une activité antimutagénique significative ($p^{**} < 0,01$).

D'autre part, on note une nette augmentation du pourcentage d'inhibition (39,31-35,63%) de l'extrait d'écorce contre la concentration 40µg /ml de 2-AF présentant un effet mutagénique moyen < 40, et une diminution de (38,27 - 54,45%) obtenue contre la concentration 80µg /ml du mutagène. Cet effet est dépendent de la concentration de l'extrait et de l'activation métabolique.

III.2 Discussion

III.2.1 L'extraction

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

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction telle que ; la granulométrie de la poudre qui est également un paramètre important ans la mesure où la réduction de la taille des particules augmente la surface de contact avec le solvant. Etant favorable au transfert de matière, cette réduction augmente le taux d'extraction (**Spigno et al., 2007**). Le temps de macération le volume et la nature du solvant sont aussi des paramètres qui affectent le taux d'extraction (**Elloff, 1998**).

Pour l'isolement de métabolites secondaires à partir des différentes complexes chimiques présentes dans les matières végétales, plusieurs solvants peuvent être utilisés ; chloroforme, acétone, acétate de l'éthyle, éthanol, méthanol et eau (**Elloff, 1998**).

Nous avons opté pour l'éthanol comme solvant, car les solvants alcooliques (éthanol, méthanol) donnent de meilleurs taux d'extraction et sont hautement sélectifs pour les polyphénols (**Spigno et al. 2007**).

Malgré que les plantes médicinales sont utilisées dans le traitement des maladies depuis plus de 60 000 ans (**Arriaga-Alba et al., 2011**) il serait faux et risqué de penser que l'utilisation des plantes médicinales est contrairement à celle des médicaments pharmaceutiques, totalement sans danger et elle nécessite pas une étude scientifique (**Kothe, 2007 ; Arriaga-Alba et al., 2011**).

Au contraire, il convient d'utiliser les remèdes à base de plantes de manière très ciblée ainsi, il est nécessaire d'étudier les propriétés chimiques et les différentes activités biologiques et surtout d'évaluer les propriétés génotoxique, afin d'éviter tout effet indésirable potentiellement dangereux pour la santé publique (**Arriaga-Alba et al., 2011**).

En effet, la capacité d'un remède à base de plantes d'influencer les fonctions corporelles dépend autant de la nature de chacune des substances actives des végétaux que la quantité ingérée (**Kothe, 2007**).

Plusieurs études a été fait sur les plantes médicinales afin d'évaluer les deux propriétés : génotoxiques et le potentiel protecteur du matériel génétique (**Arriaga-Alba et al., 2011**).

A cet effet, Et en vue de l'utilisation de *Fraxinus angustifolia* à base de remède en médecine populaire depuis les temps les plus anciens en Algérie et d'autre pays pour le traitement de ; la constipation, l'œdème, l'arthrite et les douleurs rhumatismales (**Beloued, 1998 ; Ayouni et al. 2016**). S'avère nécessaire pour nous de réalisée une étude d'évaluation sur l'effet génotoxique / antigénotoxique de l'extraits bruts des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* par un test de génotoxicité appelée : test d'Ames. Nous avons opté de réalisé ce test vue qu'il est réalisé sur des bactéries mutantes, rapides (48h à 72h) et faciles à mettre en œuvre (peux couteux) et apparaissent sensibles à une large gamme de mutagène.

Dans le corps humains, la grande majorité des produits sont détoxifiée afin d'être éliminée, ce métabolisme conduit souvent à des espèces chimiques réactives intermédiaires électrophiles, qui sont les forme mutagènes et on l'appelle : des mutagènes indirecte car elle nécessitants une activation métabolique, alors qu' il existe un autre type de mutagène

hautement réactifs exercent leurs action sans qu'il soit transformé en espèces intermédiaire (**Guengerich, 2000**). Les systèmes enzymatiques, notamment les cytochromes P-450 qui interviennent dans ces réactions se situent principalement au niveau du foie et exigent des cofacteurs (oxygène et NADPH). Ils sont aussi inductibles. Dans le test d'Ames, ce métabolisme est mimé en mélangeant un homogénat de foie de rat (appelé fraction S9) avec les bactéries et les cofacteurs nécessaires (**Forster et al., 1980**)

Au cours de cette étude, les essais ont été réalisés sur la souche *Escherichia coli* WP2 (pKM101) qui détecte des mutations par substitution des paires de bases (**Mortelmans et Riccio, 2000**). Deux mutagènes (MMS / 2AF) spécifique pour la souche ont été utilisés pour confirmer la sensibilité de la souche aux mutagènes (contrôle positifs), le choix de ces deux mutagène est basé sur leurs mode d'action (mutagène directe ou indirecte).

Le MMS est un très puissants mutagène qui agit directement sur l'ADN (Mutagène directe) qui provoquent l'addition d'un groupement méthyle sur les bases azotés (Agents méthylants), ce qui induits des lésions par substitution (mésappariement) des bases azoté (**Di sotto et al., 2012 ; Lemontt, 2012**).

Alors que 2 Aminofluorène est considéré comme un mutagène indirecte qui doit être métabolisé pour qu'il soit activée, cette activation est assurer pas le système enzymatique du foie , notamment les cytochromes P 450 exactement CYP1A1, CYP1A2, CYP1B (des iso-enzymes) qui interviennent pour transformé le 2 Aminofluorène en 2 - acétylamino-fluorène et ensuite en N- hydroxy-2- Aminofluorène , cet dernière est la forme active du mutagène qui peut causer des lésions par décalage de cadre de lecture (**Hein et al., 1993 ; Di sotto et al., 2012**) .

Les extraits éthanoliques des feuilles et d'écorce ont été testés seuls à différentes concentrations (50, 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/ml) afin d'évaluer leurs pouvoir mutagène sur la souche d'*E. Coli*. Et d'autre part les extraits ont été testés avec les concentrations (50, 100, et 200µg/ml) en présence de l'un des deux mutagènes (MMS / 2AF) avec et sans activation métabolique afin de savoir si elle possède un effet protecteur sur l'ADN.

III.2.2 Interprétations des résultats du test de génotoxicité / antigénotoxicité

Dans le test d'Ames, un résultat est considéré positif si le nombre des révertants induits par l'échantillon est au moins deux fois supérieure aux taux de révertants spontanés, avec ou sans activation métabolique, et qu'une relation dose effet est mise en évidence. Un résultat ne sera déclaré négatif que si les témoins ont donné une réponse positive (**Ames et al. , 1975 ; Maron et Ames, 1983**).

L'évaluation de l'essai des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* sur la souche *E. Coli* WP2 (pKM101) avec les différentes concentrations (50, 100, 200, 400, 800, et 1000 µg/ml) a révélé :

Un rapport de mutagénicité (RM) inférieure à 2 avec et sans activation métabolique ainsi qu'une absence de relation effet – dose (indépendant de la dose) indique que l'extrait éthanolique des feuilles et d'écorce de *F.angustiolia* ne provoque pas une mutagénicité significative ($P^{***} < 0,0001$).

Plusieurs études ont été mis en évidence la richesses de *Fraxinus angustifolia* en : coumarine ; l'escultine, la scopoletin, l'isoscopoletine, la cichoriin, fraxitine, fraxine et le fraxinol sont les coumarines majoritaires (**Kostova et Iossifova, 2007 ; Ayouni et al., 2016**) et d'après **Wong et Kitts (2006)** les coumarines (l'activation des furanocumarines) peuvent conduire à des réactions de photocycloaddition avec les bases pyrimidique de l'ADN et de l'ARN , ces cyclo additions peuvent avoir lieu sur le carbone C3 et C4 et /ou C4' et C5' avec les bases pyrimidique de l'ADN et peuvent être mono ou bifonctionnelles et dans ce dernière cas établir des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques et induire des lésions du génome ce qui explique peut-être le nombre de révertants qu'ont obtenus (**Bruneton, 1999**).

Ainsi une diminution d'environ 50 % du nombre de colonies révertants a été trouvée à partir de la dose 200 µg/ml jusqu'à la dose 1000 µg/ml par rapport celle révertants de la dose minimale (50µg /ml) pour les deux extraits. Nous suggérant que l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia* exècre un effet cytotoxique /anti bactérien sur la souche *E. Coli*. (**Kalber et al., 2014**).

Le genre *Fraxinus* est caractérisé par la présence des flavone et des flavonoles ainsi que par la quercitrine, le kaempférols et leurs glycosides sont souvent présents (**Kostova et**

ioissifova, 2007), l'action des flavonoïdes sur la cellule bactérienne est pléiotropique, c'est-à-dire qu'un même composé peut agir sur différentes cibles (**Cushnie et Lamb, 2005**) à la manière des antibiotiques les flavonoïdes peuvent cibler la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, inhiber la synthèse de l'ADN et interférer avec des voies métaboliques .

La synthèse de l'ADN peut être inhibée par certains flavonoïdes, **Bernard et ses collaborateurs (1997)** ont montré que la rutine (flavone glycosylé) est un puissant inhibiteur spécifique de la topoisomérase (4) d'*E. Coli*, plus récemment **Palper et al (2003)** ont montré que la Quercétine inhibe la topoisomérase (2) (ADN gyrase) d'*E. Coli*, en se liant à la sous unité (Gyr B).

Nos résultats est en accord avec l'étude qui a été réalisée par **Tahiri (2008)** lors de ces travaux de Magister sur la caractérisation de l'activité antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus* et de *Fraxinus angustifolia* ou elle a déterminée la sensibilité d'*Escherichia coli* aux extraits de *Fraxinus angustifolia* avec des zones d'inhibition allant de 8,3mm à 16, 2mm pour l'écorce et des zones d'inhibition allant de 10,4mm à 14,7mm pour les feuilles .

Notre essai pour l'effet mutagénique des extraits de *Fraxinus angustifolia* a confirmé l'absence totale d'un pouvoir mutagénique sur la souche *E. coli* WP2 (pKM101), ainsi que une étude d'**Atmani et al (2009)** a montré que cette plante médicinale (*Fraxinus angustifolia*) possède une forte activité DPPH et H2O2 anti oxydantes, ce qui implique la présence d'une activité antimutagénique.

Les résultats de cette étude, montre que les extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* possédants une propriété antimutagénique contre les mutations par décalage de cadre de lecture de l'ADN d'*E. Coli* WP2 (pKM101).

Les résultats ont montré que le mutagène direct MMS et ceux en absence d'activité métabolique avait induit une augmentation significative ($P^{***} < 0,0001$) avec des pourcentage d'inhibition (55,3 ; 52,3 : 46,72). Nos résultats s'accordent avec ceux rapportés par plusieurs études ayant montré que le MMS agisse en tant qu'agent mutagène direct (**Di sotto et al., 2012 ; Lemontt, 2012**)

MMS est un agent alkylants qui provoque des mésappariements au niveau de l'azote (N3) de l'adénine ou bien au niveau de l'oxygène (O6) de la guanine provoquants la

formation de 3-méthyl-adenine et 6-méthyl-guanine respectivement, testée en combinaison avec les extraits éthanoliques de *F.angustifolia* nous avons remarqué une diminution du nombre des révertants, il a été rapportée dans la littérature que cette activité agit selon deux mécanismes : le premier mécanisme fait intervenir une enzyme appelée : glycosylase qui catalyse l'excision de résidus 3-méthyl-adenine, alors que dans le deuxième mécanisme c'est l'O-6-méthylguanine transférase qui intervient pour enlever le groupement méthyle (aussi appelé enzyme suicide) (**Di Sotto et al., 2012 ; Lemontt, 2012**).

Plusieurs mutagène ne sont pas mutagénique eux même mais peuvent le devenir grâce à l'action du cytochrome P450 formant des métabolites hautement mutagénique (**Kim et Guengerich., 2005**).

Dans notre étude nous avons testé l'activité mutagénique des extraits des feuilles et écorce de *F.angustifolia* combinés au pré-mutagène 2-aminofluorène.

Elle est en accord avec plusieurs études du test de pouvoir antimutagénique des extraits de quelques plantes médicinales comme : *Temminalia arijuana*, *Stevia pylosa*, et *Stevia eupatoria*, contre les mutations par décalage de cadre de lecture (**Kaur et al., 2002 ; Carino-cortés et al., 2007**). Ainsi que elle est en accord avec les résultats de **Di Sotto et al (2012)** qui à confirmer l'inhibition de l'effet de mutagène (2AF) par l'extrait de plante *Sisymbrium officinale* sur la même souche *E. coli* WP2 (pKM101)

Alors qu'elle est différente de celle **d'Arriaga-Alba et al (2011)** qui à trouver l'absence de propriété antimutagénique de l'extrait de *Rhoeo discolor* contre les mutations par décalage du cadre de lecture provoquée par 2 AF, ces résultats contradictoire s'explique par le fait que chaque extrait de plante possède ces propre composants chimique qui peuvent interférée avec le mécanisme CYP 450 est donne donc un effet biologique différents (**Horn et Ferrao, 2003**). L'activité antimutagénique peut être due aux flavonoïdes et aux tanins et d'autre composés poly- phénolique (**Ben Ammar et al., 2008**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les études phytochimiques de *F. angustifolia* ont montré la richesse des extraits éthanoliques des feuilles et d'écorces de cette dernière en composés phénoliques, flavonoïdes, tannins, coumarines.

Notre étude est basée essentiellement sur l'évaluation du pouvoir mutagénique et antimutagénique des extraits de *F. angustifolia* sur la souche bactérienne *E.coli* WP2 (pKM101) par le test d'Ames.

Les différents tests effectués ont démontré que les extraits éthanoliques des feuilles et d'écorces de *F. angustifolia* à différentes concentrations en présence et en absence d'activation métabolique S9 ne présentent aucune activité mutagénique, cependant ces derniers présentent une activité antimutagénique dépendante de l'activité métabolique.

En se basant sur nos résultats, nous pouvons conclure que : la plante étudiée *F. angustifolia* est dépourvue de pouvoir mutagénique et présente en parallèle un potentiel antimutagénique dépendant de l'extrait utilisé et de la présence ou l'absence de l'activation métabolique.

En perspective, d'autres recherches sont nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action des composants actifs. Identifier les molécules actives responsables de l'activité testée. Réaliser des tests de génotoxicité sur des cultures cellulaires ou sur un modèle animal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31: 347–363.
- Atmani, D., Chafer, 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*, 112(2):303–309.
- Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, H.K., Atmani, D., Verpoorte, R., and Choi, Y.H. (2016). Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial crops and products*, 88: 65–70.
- Arriaga-Alba, M., Blasco José, L., Ruiz-Pérez, N.J., Sanchez-Navarrete, J., Rivera-Sanchez, R., et Gonzalez-Avila, M. (2011). Antimutagenicity mechanisms of the *Rheo discolor* ethanolic extract. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63:243-248.

B

- Baba Aissa, F. (1990). Les plantes médicinales en Algérie. Oued Zenati, Le monde pharmaceutique : p75.
- Bailly. (2004). Première floraison et changement de phyllotaxie chez *Fraxinus angustifolia* Vahl. approche architecturale et morphologie, université de Montpellier II, p222.
- Belouad, A. (1998). *Plantes médicinales en Algérie*. Office des publications nationale, Algérie : 273.
- Beloued, A. (2001). Les plantes médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaire*.
- Beloued, A. (2009). Les plantes médicinales d'Algérie.
- Benhamza, L. (2008). *Effets Biologiques de la petite centaurée Erythraeacentaurium*.
- Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, D., and Benboubetra, M. (2010). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. *J. Med. Food* 13, 896–904.
- Bézanger-Beauquesne, L., Pinkas, M. and Tork, M. (1986). *Les Plantes Thérapeutiques Modernes*. Paris : maloine .455p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blanco, M., Urios, A., and Martinez, A. (1998). New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutat. Res. Toxicol. Environ Mutagen*, 413:95–101
- Bliss, R.D. (1979). A specific method for determination of free tryptophan and endogenous tryptophan in *Escherichia coli*. *Annale Biochemistry*, 93 :390–398.
- Botineau, M. (2011). *Guide des plantes toxiques et allergisantes*. Paris
- Botta, A. (1998). Genotoxicité de doxorubicine et la ciplatine : recherche d'un témoin positif pour le test de micronoyaux. *Annales de biologie chimique*, 56(2) :183-187
- Bridges, B., mottershead, R., Green, M.H.L., and Gray, K. (1973). Mutagenicity of dichlorvos and Methyl Methane-Sulphonate for *Escherichia coli* WP2 and some derivatives deficient in DNA repair. *Mutat. Res. Toxicol. Environ Mutagen*, 19 :295–303.
- Bruneton, J. (1997). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Impr. CEE PP 315-338.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition, Bulgarian *Fraxinus* species. *Biochem Syst Ecol*, 25:271-274.
- Bryant, D., and Mccalla, D. (1980). Nitrofurantoin induced mutagenesis and error prone repair in *Escherichia coli*. *Chemistry-Biol. Interact.* 31, 151–16.
- Bundy, R., Wolker, A.F., Middleton, R., Wullis, C. and Simpson. (2008). Antichoke leaf extract (*Cynara Scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesteremic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*, 15(9):668-675.

C

- Çalış, I., Hosny, M., and Lahloub, F.M. (1996). A secoiridoid glucoside from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry* 41, 1557–1562.
- Çalış, I., Hosny, M., Khalifa, T., and Nishibe, S. (1993a). Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry* 33:1453–1456.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Christelle,B. (2009).*Phytotherapie et vigilance :Enqueteaupres des pharmaciens officinaux de l'isere.*

-Clauß, M., and Grotjohann, N. (2009). Comparative mutagenesis of *Escherichia coli* strains with different repair deficiencies irradiated with 222-nm and 254-nm ultraviolet light. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*673 : 83–86

D

-Damtoft, S., Franzyk, H., and Rosendal Jensen, S. (1995). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus* : Secoiridoid precursors. *Phytochemistry* 40, 773–784.-

-Di Sotto, A., Di Giacomo, S., Vitalone, A., Nicoletti, M., and Mazzanti, G. (2012).AntimutagenicThio Compounds from *Sisymbrium officinale*. *J. Nat. Prod.* 75 , 2062–2068.

-Djedioui, A. (2010).*Evaluation de l'activité hypophyémiont et antihyperglycémiant de l'extrait aqueux d'Inulaviscosa ; une plante de l'est Algérien chez le rat avec un diabète induit.*

-Duffaud,F., Orsiere,T., Bachiuchka-Palmaro,m., Digne,l. ,Favre,R and botta, A.(1998).genotoxicité de doxorubicine et la ciplatine : recherche d'un témoin positif pour le test micronoyaux. *Annales de biologie chimique* 56(2) 183-187.

-Dyrby, T., and Ingvarsen, P. (1983). Sensitivity of different *E. coli* and *salmonella* strains in mutagenicity testing calculated on the basis of selected literature. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 123, 47–60.

F

-Fintelmann,V.andWeiss,R.F.(2004).Manuel pratique de phytothérapie. Paris .

-Forster,R., Green,M.H.,et Priestley, A.(1980). Optimal levels of S9 fraction in the Ames and fluctuation tests: apparent importance of diffusion of metabolites from top agar. *Carcinogenesis*, 1:337-346.

E

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

Eloff, J.N., McGaw, L.J., (1998). Modern phytomedicine. turning medicinal plants into drugs. Edited by .I.Ahmed, F.Aqil, and M.Owais. 97-121

G

-Gerard, P. (2006). Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière: l'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior L.* et *F. angustifolia Vahl*). Thèse de Doctorat en Sciences Forestières. Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts, Centre de : Paris. 29-34.

-Green, M.H.L., and Muriel, W.J. (1976). Mutagen testing using trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj. 38 : 3-32.

-Guérard, M., Zeller, A., Singer, T. and Gocke, E. (2012). In vitro genotoxicity of neutral red

-Guignard, J. L. (2000). Biochimie végétale, 2ème édition, Dunord, paris. P164-173.

H

-Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert, U., Lowe, P., Suter, w., and Mueller, L. Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68:2831-2846

-Hegnauer, R., (1990). Chemotaxonomie der Pflanzen. Switzerland. Birkhauser Verlag, Basel, 9pp:160-177.

-Hein, D.W., Doll, M.A., Gray, K., Rustan, T.D., and Ferguson, R.J. (1993). Metabolic activation of N-hydroxy-2-aminofluorene and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene by monomorphic N-acetyltransferase (NAT1) and polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) in colon cytosols of Syrian hamsters congenic at the NAT2 locus. *Cancer Res.* 53, 509-514.

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

-Hosny, M., Çaliş, I. and Nishibe, S. (1991). Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Planta*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Houdret,J.C.(2004).Bien se soigner par les plantes, Un guide pratique pour traiter et affections du quotidien de toute la famille.Pocket Evaluation.p633.

I

-Iossifova, T., Kostova, I. etEvstatieva, L. (1997).Secoiridoids and hydroxycoumrains in Bulgarian *Fraxinus* species.*Biochemical Systematics and Ecology* 25:271-274.

-Ivanovska, nina, Iossifova, T., and Kostova, I. (1996). Complement-Mediated antiinflammatory action of extracts and pure Sercoidoids isolated from *Fraxinus* species. 555–558.

J

-Jallal,Z.Elatki, Y., Lyoussi,B. and Abdellaoui,A.(2015).Photochemistry of the essential oil of *Melissa officinalisl*.Growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,5 (6):458-461.

-Jensen, S.R., Franzyk, H., and Wallander, E. (2002). Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*60:213–231.

K

Kelber, O., Wegener, T., Steinhoff, B., Staiger, C., Wiesner, J., Knöss, W., and Kraft, K. (2014). Assessment of genotoxicity of herbal medicinal products: Application of the “bracketing and matrixing” concept using the example of *Valerianae radix* (valerian root). *Phytomedicine*21, 1124–1129.

Kostova, I. et Iossifova, T. (2007).Chemical components of *Fraxinus* species.*Fitoterapia*, lavoisier, Paris, 1120 p.

Koth,H.W.(2007).1000 plantes aromatiques et médicinales.Chine:Terres.328p

L

- Leclerc, H. (1994).Précis de phytothérapie. Paris : Masson.p327.
- Léonard, A. (1990).Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologique .Masson,ed,Paris :p306.
- Lutz,M., Henriquez,C. andEscobar,M.(2011) chiminal composition and antioxydant properties of moture and bobyantichokes (CymaraScolymus),raw and cooked .*Journal of food Composition and Analysis*,24(1):49-54.

M

- Mahmoudi,Y.(1987).La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Blida : Edition ANES plais dus livre .105.
- Maistro,E., Yonekubo,B. and Marques,E.(2015).Genotoxic assessment of crataequsoxycantha fruits extract in cells of mice.*Toxicology Letters*,238(2):1-95
- Maron, D., and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. 173–215.
- Mendel,M., Chlopecha,M., Dziekan, N.andwiechetek,M.(2011).The effet of the whole extract of common ivy (Hedra helix leaves and selected active substances on the motric activity of rat isolated stomach strips.*Journal of ethanopharmacology*,4(3):796-802.
- Mortelmans, K. and Riccio, E.S. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 61–69..
- Mortelmans,K.andZeiger, E. (2000).The Ames *Salmonella*/microsomesmutagenicityassay.*Mutation Research* 455, 29–60.
- Mošovská, S., Mikulášová, M., Brindzová, L., Valík, Í., and Mikušová, L. (2010). Genotoxic and antimutagenic activities of extracts from pseudocereals in the Salmonella mutagenicity assay. *Food Chem. Toxicol.*48: 1483–1487..
- Myriam, A.-A., José Luis, B., Nancy Jannete, R.-P., Jaime, S.-N., Roberto, R.-S., and Marisela, G.-A. (2011). Antimutagenicity mechanisms of the Rhoeo discolor ethanolic extract. *Exp. Toxicol. Pathol.*63, 243–248.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

N

Natarajan,A.andObe,G.(1984).Molecular mechanisme involved in the production of chromosomal aberration .chromosoma,90:120-127.

P

-Philippe,BA., Karine,N., Barthélemy, AK.,Noél,ZG., David,NJ.,Joseph,DA. andHosttetman,K.(2010).Bio-guided Isolution of Antioxidant Compounds from chrysophyllum,aplant used in the Ivory coast Pharmacopiee.*Molecules*,15(2):6386-639.

Philippe,BA., B'guessan,BB., Yapo,AF., N'guessan,JD. and Djaman,AJ.(2011).Activités antioxydants de dix plantes medicinales de la pharmacopiee Ivoirienne .*Sciences et Nature*,8(1) :1-11

R

-Ramesh, C., and *al* (2014).Antimutagenic activity of root extract of Picrorhizakurroa using Ames test in both dose dependant cytotoxic assay and mutagenicity study.*J. Pharmacogn.Phytochem.* 2.

-Raneau,J.C.Mausion.,Dumé,G.,Timbale,J.,Lecointe,A.,Duport,P.,keller,R(1989). Plante a Fleurs .In flore Forestière Française-1- plaine et collines .Institut pour développement Forestier .pp :225-700.

S

-Sarni-Manchado,P. and veronique ,C .(2006).Les polyphénols en agroalimentaires.Paris :Technique et Documentation.p398.

-Schauenberg,P(2013).*Les plantes médicinales.medic.*Paris :delachaux et niéstlé.p396.

Smull,E.etCatling P.M.(2000).Les cultures médicinales condiennes.NationalResearch Council Conader, Conseil national de Recherches Conader.p 281.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Spigno, G., Tarmelli, L., Defaveri, D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1):200-208.

W

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

-Wei, Z. et Green, P.S. (1996). *Fraxinus Linnaeus*. Pages in Wu, Z. ET Raven, P.H. Editions, *Flora of China*, Vol. 15, Science Press, Beijing, China and Missouri Botanical Garden.

-Yon, Z., Fan, R., Yin, S., Zhao, X., Liu, J. and Li, L. (2015). Protective effects of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharide on nonalcoholic fatty liver disease and its mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80:573-580.

Références électroniques

www.woodlands.co.uk/ consulté le : 03-02-2016

www.flickr.com/ consulté le : 03-02-2016

www.jerry-coleby-williams.net/ consulté le : 03-02-2016

www.danwiz.com/ consulté le : 03-02-2016

www.fruitiers-rares.info/ consulté le : 03-02-2016

www.visoflora.com/ consulté le : 03-02-2016

www.kuleuven-kulak.be/ Consulté le : 03-02-2016

Annexe 1

Milieu minimum :(Davis)		Top agar		Gélose nutritive	
-Agar 20g	15g	- Agar	6g	-Bactoagar	
- glucose 20g	4g	- Chloride de sodium (Na Cl)	5g	-Bouillon nutritif	
-Sodium citrate 1Litre	0.5g	-L'eau distillé	1 Litre	-L'eau distillé	
-Ammonium sulfate	1g				
-K ₂ HPO ₄	7g				
-KH ₂ PO ₄	3g				
Bouillon nutritif		Solution tryptophane		Solution Ampicilline	
-Bouillon nutritif	20g	-Tryptophane	100mg	1 ^{er} concentration : 1,25mg/ml	
-L'eau distillé distillée	1Litre	-L'eau distillé	100ml	12,5mg d'Ampicilline dans 10ml de l'eau	
				2 ^{eme} concentration : 8mg/ml	

Annexe 1

80mg d'Ampicilline dans 10ml de l'eau

distillée

Solution saline (1,65Kcl+0,4Mgcl) pour le S9 mix

-Chloride de potassium Kcl (base)	61,5g
-Chloride de magnésium (Mgcl ₂ ·6H ₂ O) (acide)	40,7g
-L'eau distillée	500ml

Solution tampon phosphate (PH=7,4)

A-7,16g de Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	100ml d'eau distillée
B- 2,72g de KHPO ₄	100 ml d'eau distillée

Résumé

Fraxinus angustifolia (Oleaceae) est l'une des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des différentes pathologies. Les effets génotoxiques des extraits éthanoliques de *Fraxinus angustifolia* ont été étudiés dans un système d'essai bactérien, test Ames sur la souche *E.coli* WP2 (pKM101). La génotoxicité induite par le méthyle méthane sulfonate et 2-aminofluorène en absence et en présence de l'activation métabolique (S9) respectivement a été évaluée. Il a été observé que MMS et 2-AF possèdent un pouvoir mutagénique très significatif ($P^{***}<0.0001$), cependant les différentes concentrations des deux extraits ne présentaient aucune activité mutagénique en présence et en absence de S9. Cette étude révèle que l'extrait d'écorce avec le mutagène directe MMS sans S9 a un effet antimutagénique significatif ($P^{**}<0.01$), et l'extrait des feuilles avec le mutagène indirecte 2-AF possède un potentiel antimutagénique significatif ($P^{**}<0.01$) avec S9, donc l'effet antimutagénique dépend de l'activation métabolique et les extraits testés, mais le mécanisme d'action de ces derniers reste inconnu.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, Test Ames, 2-aminofluorène, méthyle méthane sulfonate, génotoxicité, S9

Abstract

Fraxinus angustifolia (Oleaceae) is one of the plants used in traditional medicine in the treatment of various pathologies. The genotoxic effects of ethanolic extracts of *Fraxinus angustifolia* were studied in a bacterial test system, Ames test on the strain *E.coli* WP2 (pKM101). Genotoxicity induced by methyl methane sulfonate and 2-aminofluorene in absence and in the presence of metabolic activation (S9) respectively has been evaluated. It has been observed that MMS and 2 - AF have very significant mutagenic power ($P^* < 0.0001$), however the different concentrations of both extracts showed no mutagenic activity in the presence and absence of S9. This study reveals that the bark extract with the direct mutagenic MMS S9 has a significant antimutagenic effect ($P^* < 0.01$), and the extract of the leaves with the indirect mutagenic 2 - AF has a significant antimutagenic potential ($P^* < 0.01$) with S9, therefore the antimutagenic effect depends on the metabolic activation and extracts tested, but their mechanism of action remains unknown.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, Ames test, 2-aminofluorene, methyl methane sulfonate, genotoxicity, S9.

ملخص :

الدردار (*Fraxinus angustifolia*): من النباتات الطبية المستخدمة على نطاق واسع من قبل السكان المحليين لعلاج العديد من الأمراض. ولإيجاد تبرير علمي لاستعمالها قمنا في المختبر باتتباع تجربة Ames على بكتيريا (*Escherichia coli*) بغرض دراسة مدى التأثير الطفري السام أو درجة الحماية من التأثير الطفري السام من بعض مسببات الطفرة للمستخلص الايثانولي لأوراق ولحاء الدردار على الحمض الريبي النووي (ADN). النتائج أظهرت أن : مثيل ميثان سولفونات (MMS) و 2 أمينو فيوران (2AF) كمسببات للطفرة لهما تأثير جد سام على خلايا البكتيريا في وجود أو غياب التنشيط الانزيمي الكبدي (S9). في حين أنه لم يتم تسجيل أي تأثير طفري لكلي المستخلصين الايثانولي للدردار في وجود أو غياب التنشيط الانزيمي الكبدي. من جهة اخرى وجدنا أن للمستخلص الايثانولي لأوراق ولحاء الدردار حماية معتبرة للحمض الريبي النووي من التأثير الطفري السام لمسببات الطفرة (MMS / 2AF) وذلك في وجود التنشيط الكبدي. ومنه يمكن قول : أن للمستخلص الايثانولي لنبات الدردار حماية للحمض الريبي النووي لخلايا البكتيريا من مسببات الطفرة في وجود أو غياب التنشيط الانزيمي الكبدي في حين تبقى طريقة التأثير والمكونات المسؤولة مجهولة.

الكلمات المفتاحية : الدردار ' تجربة Ames ' مثيل ميثان سولفونات ' 2 أمينو فيوران ' التأثير الطفري السام ' التنشيط