

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique



Réf:.....

# Mémoire de Master

Filière: Sciences Biologiques

Option: Génétique Appliquée

Thème

**Etude de la génotoxicité/antigénotoxicité  
des extraits de l'écorce de *Fraxinus  
angustifolia In vivo.***

Présenté par :

BELAID AMINA et RAHMANI MOHAMED ABDELHAK

Soutenu le : 18 Juin 2016 à 9h00

## Composition du jury

M <sup>lle</sup> AIT-ALI D.	MCB	President
M <sup>lle</sup> AYOUNI K.	MAA	Encadrante
M <sup>me</sup> ABDERRAHIM S.	MAA	Examinatrice

Année Universitaire : 2015/2016

# Remerciements

*Louanges à Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, et l'énergie nécessaire à l'accomplissement de ce travail.*

*Nous tenons à remercier profondément notre promotrice **Melle Ayouni K.** d'avoir acceptée de nous encadrer dans ce travail. Nous lui sommes reconnaissants des sacrifices, des conseils, et de sa présence permanente. Sa patience et sa persistance durant ces longs mois de labeur nous ont permis de mener à terme notre mémoire de fin d'étude.*

*Nous remercions chaleureusement **Melle Ait-Ali D.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant avec humilité de présider le jury de soutenance.*

*Nous remercions également **Mme Abderrahim S.** d'avoir acceptée d'examiner notre humble travail.*

*Nous ne remercierons jamais assez les personnes qui ont collaborés à la réalisation de ce travail, plus particulièrement l'équipe du laboratoire de Biochimie Appliquée, Nous citerons, **Mme Rahmani M.** pour ses conseils et sa jovialité qui nous ont permis de garder le cap dans les moments difficiles.*

***Melle Bouguellid G.** pour nous avoir partagé un nombre inestimable de connaissances scientifiques et de conseils qui nous ont servis durant nos travaux.*

***Mme Ouatah A.** Ingénieur du laboratoire de Biologie et physiologie animale, pour son aimable accueil et la mise à disposition des microscopes optiques.*

***Mr Bouchenoua F.** Ingénieur du laboratoire de Biologie physico-chimique, pour nous avoir permis de réaliser quelques étapes de ce travail dans de bonnes conditions.*

*Enfin, nous remercions tous les enseignants qui nous ont encadrés durant notre cursus, ainsi qu'au Chef de département de Biologie Physico-Chimique **Mr Hammoum M.** et au Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, **Mr Atmani D.***

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes parents;*

*A mes frères;*

*A ma sœur;*

*A mes proches, particulièrement à mes tantes et mes cousins; avec une pensée particulière à celles qui ne sont plus là, mes grands-mères;*

*A tous ceux avec qui j'ai partagé cette unique expérience;*

*A mon camarade, Abdelhak ;*

*A l'équipe de choc du 413, tellement de choses partagées ensemble;*

*Et pour finir, à mon Rh(-) qui se reconnaîtra.....*

*MINA*

# Dédicaces

**Nous travaillons pour les autres jusqu'à notre vieillesse et quand notre heure viendra, nous mourrons sans murmure, et nous dirons dans l'autre monde que nous avons souffert, que nous avons pleuré, que nous avons vécu de longues années d'amertume, et Dieu aura pitié de nous.**

**A. Tchekhov.**

**Je dédie cette citation et cet humble travail à toutes les personnes qui m'ont soutenu dans l'élaboration de ce mémoire, à celles qui se sont éteintes et celles qui demeurent en vie.**

**Je n'aurais sans doute jamais pu réaliser ce parcours sans les vœux de courages et les conseils que m'ont donnés ces personnes, dont je ne citerai aucune au risque d'en oublier quelqu'un.**

**Enfin, ces quelques mots sur une feuille véhiculent toute la gratitude et l'amour que je porte envers ceux-là, mes parents, mon frère, mes oncles et mes tantes, et mes amis.**



**Merci.**

**RAHMANI Mohamed Abdelhak.**

# *Liste des Abréviations*

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique.

**AGE :** Anti-génotoxicité écorce

**ANOVA:** Analyse of Variance (Analyse de la variance).

**C- :** Contrôle négatif

**C+ :** Contrôle positif

**CA:** Chromosomal Aberration Assay(test des aberrations chromosomiques).

**CMC:** Carboxymethyl cellulose.

**CP:** Cyclophosphamide.

**GE:** Génotoxicité écorce

**His:** Histidine.

**IM:** Indice Mitotique.

**KCl:** Chlorure de potassium.

**NMRI:** Souris de type (Naval Medical Research Institute).

**PA:** Pourcentage d'Aberrations.

**ROS:** Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène).

**rpm:** Rotation par minute.

**SEM :** Somme des Ecart Moyens.

**Sp.:** espèce.

**Subsp:** Sous-espèce.

**5-BU<sub>t</sub>:** 5-Bromo Uracile (t : thymine).

**5-BU<sub>c</sub>:** 5-Bromo Uracile (c : cytosine).



## *Liste des Figures*

N° figure	Titre de la figure	N° page
01	Photographie originale de l'arbre <i>Fraxinus angustifolia</i> .	5
02	Schéma représentatif de la formation des sécoiridoïdes.	9
03	Structures des secoiridoïdes présents chez <i>Fraxinus angustifolia</i> .	10
04	Structure chimique de l'hydroxytyrosol et du tyrosol.	11
05	Structure chimique du verbascoside.	11
06 (a)	La thymine et son analogue structurel.	14
06 (b)	Schéma de substitution de base par le 5-bromoUracile.	14
07	Intercalation de l'acridine orange dans de l'ADN.	15
08	Effets des dommages causés par les ROS sur la cellule.	16
09	Dérivés métaboliques du Cyclophosphamide.	18
10	Mécanisme d'alkylation des moutardes azotées.	18
11	Photographie originale d'une souris utilisée lors de l'expérimentation.	22
12	Localisation géographique du lieu de récolte des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	23
13	Photographie originale des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	24
14	Photographie originale d'un lot de souris, de gavage et d'une injection intrapéritonéale.	26
15	Photographie originale du prélèvement des fémurs et extraction de la moelle osseuse.	27
16	Photographie originale des étapes de fixation, coloration et observation des lames.	28
17	Représentation graphique des indices mitotiques (%) des groupes témoins négatif (CMC 0.8%) et positif (CP 50mg/kg), males et femelles.	30
18	Représentation graphique des cellules aberrantes (%) des groupes témoins négatif (CMC 0.8%) et positif (CP 50mg/kg).	31
19	Photographie originale des différents types d'aberrations chromosomiques induites par le CP, détectées lors de l'analyse des cellules de la moelle osseuse des souris sous microscope optique GX100.	33

20	Représentation graphique des indices mitotiques (%) de l'effet cytotoxique des différentes concentrations d'extrait éthanoliques des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> (250, 500 et 1000 mg/kg) sur les cellules de la moelle osseuse des souris.	34
21	Représentation graphique des cellules aberrantes (%) de l'effet génotoxique des différentes concentrations d'extrait éthanoliques des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> (250, 500 et 1000 mg/kg) chez les souris.	35
22	Représentation graphique des indices mitotiques (%) de l'évaluation de l'effet anti-cytotoxique des concentrations d'extrait éthanoliques des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> (125 et 250mg/kg).	37
23	Représentation graphique des cellules aberrantes (%) de l'évaluation de l'effet anti-génotoxique des concentrations d'extrait éthanoliques des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> (125 et 250mg/kg).	38

## *Liste des Tableaux*

N° tableau	Titre du tableau	N° Page
I	Tableau de quelques plantes proches de <i>Fraxinus angustifolia</i> ainsi que leurs activités.	4
II	Classification botanique de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	6
III	Structures et activités des dérivés coumariniques du genre <i>Fraxinus</i> .	8
IV	Schémas des aberrations chromosomiques et chromatidiques	13
V	Tableau récapitulatif des traitements de souris.	25
VI	Types et fréquences des aberrations chromosomiques chez les lots témoins.	32
VII	Tableau récapitulatif de des types et abondances des aberrations chromosomiques chez les mâles et femelles traités aux concentrations de l'extrait d'écorce de <i>F.angustifolia</i> .	36
VIII	Tableau récapitulatif de des types et abondances des aberrations chromosomiques chez les mâles et femelles traités par les extraits d'écorce de <i>F.angustifolia</i> pour évaluer l'antigénotoxicité.	39

# *Sommaire*

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

## ***CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

I.1.PLANTES MEDICINALES ET USAGE THERAPEUTIQUE.....	03
I.2.DESCRPTION BOTANIQUE DE <i>FRAXINUS ANGUSTIFOLIA</i> .....	05
I.2.1.DESCRPTION DE LA PLANTE.....	05
I.2.2.CLASSIFICATION .....	06
I.3.COMPOSANTS PHYTO-CHIMIQUES DE <i>FRAXINUS ANGUSTIFOLIA</i> .....	07
I.3.1.COUMARINES .....	07
I.3.2.SECOIRIDOÏDES .....	09
I.3.3.PHENYLETHANOÏDES .....	11
I.4.LES BASES DE LA GENETIQUE TOXICOLOGIQUE.....	12
I.4.1.ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES ET CHROMATIDIQUES.....	12
I.4.2.LES MUTATIONS GENIQUES .....	14
I.4.2.1.REMPLACEMENT D'UNE BASE PAR UN ANALOGUE STRUCTUREL.....	14
I.4.2.2.AGENTS INTERCALANTS.....	15
I.4.2.3.RAYONS ULTRAVIOLETS .....	15
I.4.2.4.AGENTS ALKYLANTS .....	17
I.5.TESTS EMPLOYES POUR L'ETUDE D'UNE GENOTOXICITE .....	19
I.5.1.TEST DE AMES.....	19
I.5.2.TEST DES COMETES .....	20
I.5.3.TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES .....	20

## ***CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES***

II.1.MATERIEL ANIMAL .....	22
II.2.MATERIEL VEGETAL.....	23

II.3.PRODUITS CHIMIQUES .....	24
II.4.PREPARATION DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES ECORCES DE <i>FRAXINUS ANGUSTIFOLIA</i> .....	25
II.5.EVALUATION DE LA GENOTOXICITE .....	25
II.5.1.ADMINISTRATION DES DOSES AUX SOURIS .....	25
II.5.2.SACRIFICE DES SOURIS ET PRELEVEMENT DE LA MOELLE OSSEUSE .	26
II.5.3.FIXATION DES CELLULES SUR LES LAMES, COLORATION, ET EXAMEN MICROSCOPIQUE .....	27
II.6.TRAITEMENT DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES.....	29

### ***CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION***

III.1. RESULTAT DE L'EXTRACTION .....	30
III.2. INDUCTION DE LA GENOTOXICITE PAR LE MUTAGENE .....	30
III.2.1.INDICE MITOTIQUE .....	30
III.2.2.POURCENTAGE DE CELLULES ABERRANTES .....	31
III.3. EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES DOSES DE L'EXTRAIT DE L'ECORCE DE <i>F.ANGUSTIFOLIA</i> .....	34
III.3.1. INDICE MITOTIQUE .....	34
III.3.2.POURCENTAGE DE CELLULES ABERRANTES .....	35
III.4. EVALUATION DE L'EFFET COMBINE DE L'EXTRAIT DE L'ECORCE DE <i>F.ANGUSTIFOLIA</i> ET LE MUTAGENE .....	37
III.4.1.INDICE MITOTIQUE .....	37
III.4.2.POURCENTAGE DE CELLULES ABERRANTES .....	38
III.5.DISCUSSION .....	40
CONCLUSION .....	44
REFERNCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

# *INTRODUCTION*

Les plantes médicinales ont été largement utilisés dans le monde entier au cours des siècles pour le traitement de diverses maladies, et près de 80% des populations mondiales comptait sur les herbes médicinales pour leurs soins primaires (Ang, 2010; Chaudhary et Payasi, 2013).

Malgré la large utilisation de médicaments à base de plantes, les données sur leurs compositions chimiques sont très rares (Ang *et al.*, 2010), et peuvent être source de plusieurs activités bénéfiques et/ou non bénéfiques(Chaudhary et Payasi, 2013).

Utilisé en médecine traditionnelle locale, *Fraxinus angustifolia* est réputée pour ses activités thérapeutiques diverses, et utilisé comme diurétique, purgatif, et autres. Cet arbre est reconnu également pour son bois et sa croissance rapide comme étant l'une des principales plantations d'arbres en Europe (Çiçeket *al.*, 2002).

Des études antérieures ont révélés un large éventail de composés répartis sur les fleurs, les feuilles, et l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, à l'instar des polyphénols et des coumarines reconnus, entre autres, pour leurs activités anti-inflammatoires et antioxydants, d'autres composés encore tels que la quercétine et l'acide tanique sont présents dans les écorces et possèdent respectivement une excellente activité anti-oxydante et astringente (antidiarrhéique) (Kostova *et al.*.,2007).

En dépit de l'attention scientifique portée sur cette plante concernant ces bienfaits thérapeutiques grâce à sa richesse en composés et leurs activités citées précédemment, et suite aux travaux menés au laboratoire de Biochimie appliquée sur *Alium cepa*, et aux résultats prometteurs concernant l'activité antigénotoxique des extraits des écorces de *Fraxinus angustifolia*, il est non moins important de traiter un des aspects cytotoxique de cette plante, et en particulier l'aspect génotoxique et antigénotoxique que pourrait avoir *Fraxinus angustifolia* sur un modèle animal.

Le choix des tests, *In vivo* sur un modèle murin présente des avantages d'envergure dans la mesure où les conditions d'élevage, la prolificité, et le degré d'homologie entre le génome murin et humain en font un modèle idéal dans ce type d'investigation (Fox *et al.*, 2006).

A cet effet, ce travail sera porté sur l'étude de l'activité génotoxique et antigénotoxique des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia*, afin de tenter de savoir à quelles concentrations, ces extraits peuvent avoir un impact négatif ou positif sur l'intégrité physique et fonctionnelle du génome, d'une part, et d'autre part, d'avoir une idée sur la nature des composés qui pourraient jouer un rôle dans ce type d'activité.

*CHAPITRE I*

*REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE*

**I.1. PLANTES MEDICINALES ET USAGES THERAPEUTIQUES**

Par définition, une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques, une ou plusieurs parties de la plante peuvent renfermer des composés agissant naturellement contre plusieurs pathologies, d'autre part, on attribue le nom de plante médicinale à toute plante ayant des propriétés médicamenteuses susceptibles de guérir ou d'atténuer une maladie. Cependant, l'efficacité d'une plante médicinale contre une quelconque maladie relève de la nature de ses composés (**Srivastava et al., 1996**).

L'usage des plantes médicinales est très ancien, et les espèces de plantes utilisées par l'Homme jusqu'à nos jours sont indénombrables, les plantes médicinales utilisés en médecine traditionnelle pourraient constituer un apport lucratif pour les industries pharmaceutiques, elles peuvent, en effet, être pures ou complexées (hémi-synthétique) à des produits de synthèse dans le but d'atténuer les effets secondaires d'un médicament, et de rapprocher du mieux possible, sur un plan structural, certains médicaments de leurs analogues naturels. Cependant, l'usage industriel de ces plantes médicinales devra être soumis à des réglementations rigoureuses quant à la récolte, la purification, ainsi que le brevetage de ces plantes, dans le but de s'assurer que les plantes utilisées sont pures et d'éviter une confusion entre espèces voisines (**Da et al., 2015**).

Certaines plantes médicinales célèbres à l'instar des thym, tilleuls, sauges, menthes, et gingembres, sont reconnus respectivement, pour combattre la toux sèche des voies respiratoires, les angines et les gripes, les troubles menstruels chez les femmes, les troubles digestifs, l'inflammation et les insuffisances hépatobiliaires (**Moulaoui et al., 2015**).

Quant à *Fraxinus angustifolia*, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour ses activités diurétique, digestive, et astringente, l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est reconnue pour son activité anti-oxydante liée à la composition de cette partie de plante en flavonoïdes tels que la quercétine (glycosylée), la rutine, et le kaempférol (**Ayouni et al., 2016**), néanmoins, bon nombre de flavonoïdes ont un potentiel mutagène, parmi pas moins de 60 flavonoïdes étudiés, la quercétine est le mutagène le plus fort (**Nagao et al., 1981**).

Le tableau I représente quelques plantes médicinales de la famille de *Fraxinus angustifolia* et leurs activités biologiques :

**Tableau I :** Tableau de quelques plantes proches de *Fraxinus angustifolia* ainsi que leurs activités.

Noms vernaculaires	Nom scientifique	Principes actifs	Activités
Forsythia. Mimosa de Paris.	<i>Forsythia suspensa</i>	Lignanes, flavonoïdes	Activité anti- oxydante et anti- bactérienne ( <b>Qu et al., 2012</b> ).
Olivier. Boutaillon.	<i>Olea europaea</i>	Secoïridoïdes (ligstroside), triterpènes, flavonoïdes (rutoside)	Activités anti- diabétique, diurétique, vasodilatatrice ( <b>Bouarroudj et al., 2016</b> ).
Jasmin	<i>Jasminum officinalis</i>	Acide salicylique, alcool terpénique (linalol).	Anti-hépatite B ( <b>Zhao et al., 2013</b> ).
Muiru puama. Maranta.	<i>Ptychopetalum olacoïdes</i>	Terpènes, coumarines, alcaloïdes, stéroïdes.	Activité anti- oxydante et neuroprotective ( <b>Siqueira et al., 2007</b> ).
Troène. Frésillon.	<i>Ligustrum vulgare</i>	Tanins, triméthylamines, mellifères.	Activité anti- oxydante ( <b>Nagy et al., 2006</b> ).

**I.2.DESCRPTION BOTANIQUE DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*****I.2.1.DESCRPTION DE LA PLANTE**

*Fraxinus angustifolia* (figure 01), ou de ses noms vernaculaires, frêne à feuilles étroites ou encore frêne du midi, est un arbre de la famille des Oléacées (**Hinsinger et al., 2014**) mesurant 20 à 25 mètres et pouvant aller jusqu'à 40 m de hauteur et 1,5m de diamètre (**de Rigo et al., 2016**). C'est une espèce vivace, retrouvée dans les eaux douces et ripisylves, et est largement répandue en méditerranée, en Europe, et retrouvée aussi en Afrique du sud ainsi qu'en Australie. (**Wallander, 2008**).



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

Les feuilles sont composées, disposé par groupes de 7-13 folioles, impaires, pennées, et minces; 3-8 cm de long et 1-1,5 cm de large, vertes brillantes et aux bordures dentées, et le fruit est une samare 3-4 cm de long, aplati, avec une aile distale, récoltée sur les arbres en

novembre après la chute des feuilles (Wallander, 2008 ; Wallander., 2013, Caudullo et Houston, 2016). La couronne du frêne est dense, irrégulière et en forme de dôme, avec des pousses courtes et tombantes, ses rameaux et les pétioles sont glabres et ses bourgeons sont sombres marron, son écorce est grise et devient finement et profondément réticulée et fissurée. L'espèce est monoïque avec inflorescences hermaphrodites (de 10-30 fleurs); cependant quelques inflorescences avec des fleurs pures mâles peuvent apparaître (andromonoïque) (Caudullo et Houston, 2016).

Sur la base des données moléculaires et morphologiques, trois sous-espèces géographiques sont reconnues: Les cendres à feuilles étroites (*Fraxinus angustifolia* subsp. *angustifolia*) dans le sud-ouest de l'Europe et en Afrique du nord-ouest, la cendre Caucasiennne (*Fraxinus angustifolia* subsp. *oxycarpa*) en Europe centrale, Balkans et la région de la mer noire, et la cendre syrienne (*Fraxinus angustifolia* subsp. *syriaca*) dans le sud-est de l'Anatolie, Moyen-Orient à l'Iran (Wallander., 2013; Caudullo et Houston, 2016).

### I.2.2.CLASSIFICATION

Selon l'inventaire *National du Patrimoine Naturel* du Muséum National d'Histoire Naturelle, *Fraxinus angustifolia* a été classifiée, comme illustrée dans le tableau II suivant :

**Tableau II** : Classification botanique de *Fraxinus angustifolia*.

<b>Règne</b>	<i>Plantae (Haeckel, 1866)</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta (Cronquist et al., 1966)</i>
<b>Classe</b>	<i>Equisetopsida (Agardh, 1825)</i>
<b>Ordre</b>	<i>Lamiales (Bromhead 1838)</i>
<b>Famille</b>	<i>Oleaceae (Hoffmannsegg et Link, 1809)</i>
<b>Genre</b>	<i>Fraxinus (Linné, 1753)</i>
<b>Espèce</b>	<i>Fraxinus angustifolia (Vahl, 1804)</i>

**I.3.COMPOSANTS PHYTO-CHIMIQUES DE *FRAXINUS ANGUSTIFOLIA***

Un large éventail de composés tels que les sécoiridoïdes, les coumarines, les flavonoïdes, et les lignanes, ont été identifiés chez les espèces de *Fraxinus* et reconnus pour leurs activités anti-inflammatoire, antimicrobienne, anti-oxydante, antiallergique, diurétique, cependant, les composés majoritaires retrouvés chez *Fraxinus angustifolia* sont les sécoiridoïdes, les phenylethanoïdes, et les coumarines (**García-Villalba et al., 2015**).

Ces composés appelés molécules bioactives, dérivent du métabolisme secondaire des plantes, ils ne constituent pas des éléments fondamentaux pour la survie de la plante tels que les produits du métabolisme primaire (lipides, protéines, glucides, sels minéraux, acides nucléiques), et ils ont été longtemps considérés comme des déchets métaboliques, ce n'est qu'après plusieurs études faites sur le métabolisme végétal qu'il a été admis que ces composés avaient un rôle important dans la vie de la cellule, notamment dans la structure des plantes et dans les mécanismes de défenses (**Hopkins.W., 2003**).

Dans ce travail, la structure, les dérivés, et les activités des principales biomolécules contenues dans l'espèce *Fraxinus angustifolia* seront détaillées.

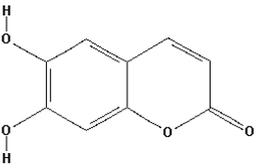
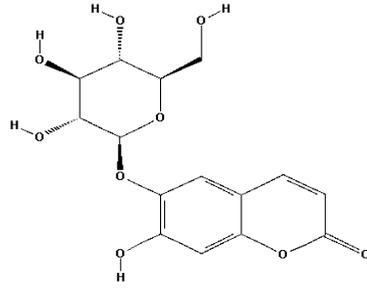
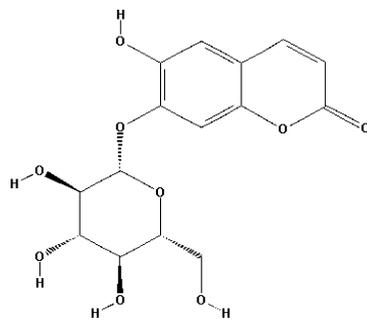
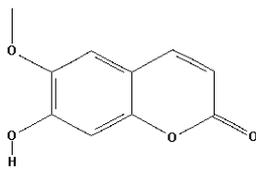
**I.3.1.COUMARINES**

Les coumarines, ou de leur nomenclature internationale: 2H-1-benzopyrane-2-1, sont une large famille de composés organiques aromatiques, possédant des hydroxyles phénoliques pouvant être méthylés ou engagés dans des liaisons hétérosides.

Les coumarines sont utilisées en cosmétique dans la fabrication de parfums, et dans l'industrie alimentaire, cependant, une réglementation stricte s'impose quant à leur utilisation dans les domaines décrits ci-dessus à cause de leur hépatotoxicité (**Fentem et Fry, 1993**). Néanmoins, ces dérivés sont largement utilisés en médecine pour leurs activités antimicrobienne, et neuroprotectrice (**Wang C, 2012 ; Abou-Hussein et Linert, 2013**).

Les dérivés coumariniques présents dans *Fraxinus angustifolia* sont décrits dans le tableau III :

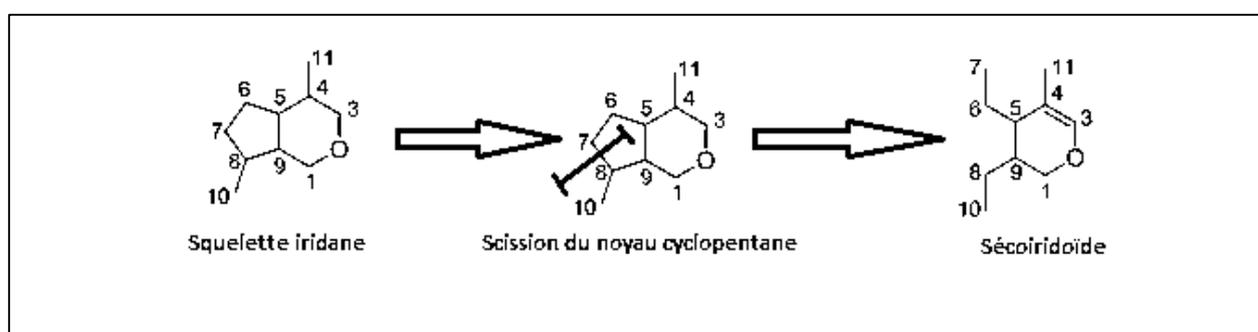
Tableau III : Structures et activités des dérivés coumariniques du genre Fraxinus.

Dérivés	Structures[1]	Abondance chez les Sp de frênes. [2, 3]	Activités
Esculetine		<i>F.angustifolia</i> , <i>F.americana</i> , <i>F.chinensis</i> , <i>F.excelsior</i> , <i>F.japonica</i> , <i>F.lanceolata</i> , <i>F.oregona</i> , <i>F.ornus</i> , <i>F.Sogdiana</i> , <i>F.syriaca</i> .	Anti-cancéreuse (Kimet <i>et al.</i> , 2015). Hypoglycémiant (Prabakaran <i>et al.</i> , 2012).
Esculine		<i>F.angustifolia</i> , <i>F.americana</i> , <i>F.chinensis</i> , <i>F.excelsior</i> , <i>F.japonica</i> , <i>F.lanceolata</i> , <i>F.oregona</i> , <i>F.ornus</i> , <i>F.toumeyii</i> .	Anti-inflammatoire (Niu <i>et al.</i> , 2015). Anti-apoptotique (Zhao <i>et al.</i> , 2007).
Cichorioside		<i>F.angustifolia</i> , <i>F.americana</i> , <i>F.carolinana</i> , <i>F.excelsior</i> , <i>F.lanceolata</i> , <i>F.oregona</i> , <i>F.sogdiana</i> , <i>F.syriaca</i> , <i>F.toumeyii</i> .	Anti-inflammatoire, hépatoprotectrice, antidiabétique. (Kisiel <i>et al.</i> , 2002).
Scopolétine		<i>F.angustifolia</i> , <i>F.excelsior</i> , <i>F.japonica</i> , <i>F.ornus</i> , <i>F.pallisiae</i> .	Effet anti-stéatose hépatique. (Lee <i>et Al.</i> , 2014).

[1]: (Voir références Internet). [2] : (Artem'eva et al., 1975). [3]: (Plouvier, 1968).

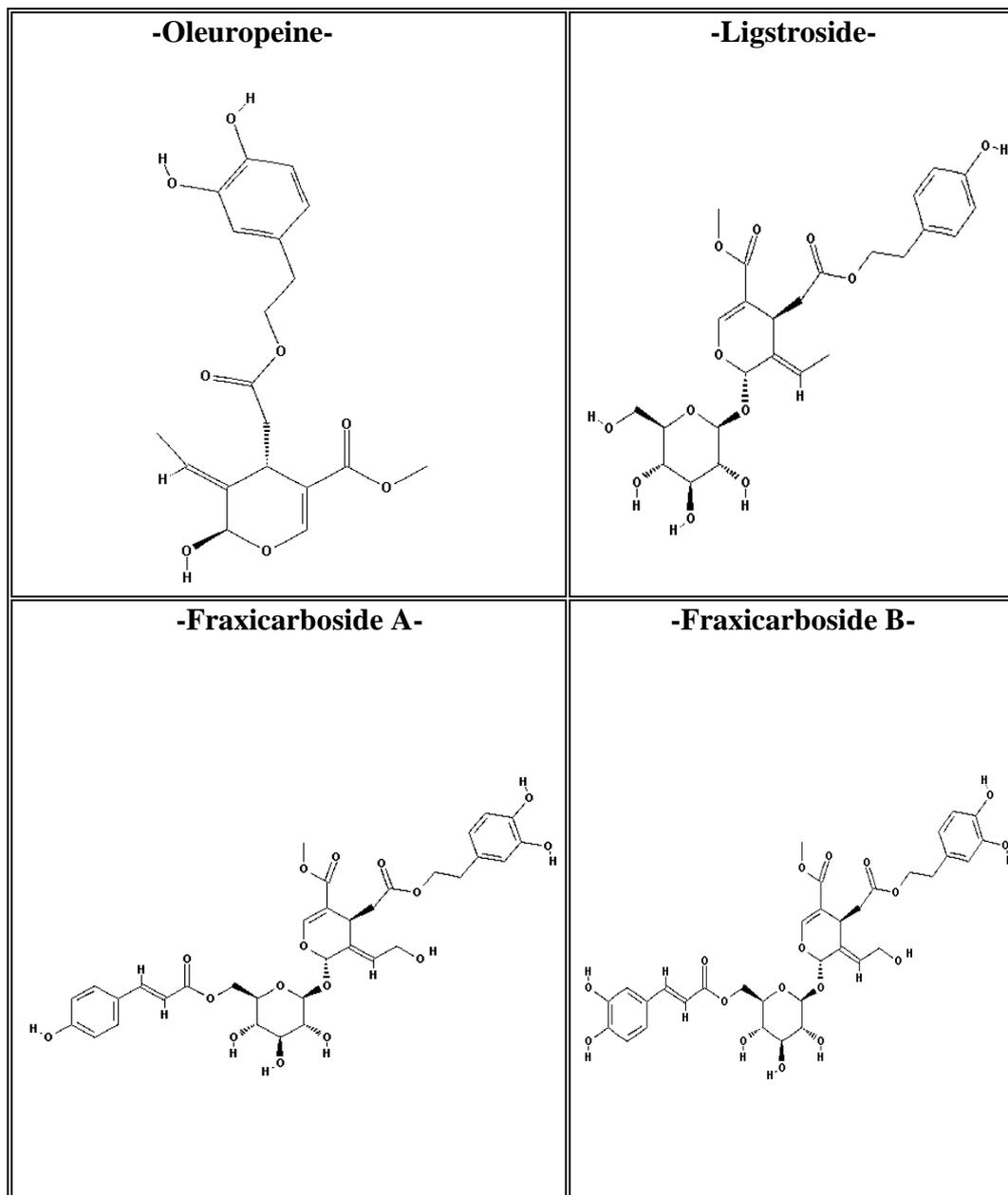
### I.3.2.SECOIRIDOÏDES

Les sécoiridoïdes sont des composés voisins de la famille des iridoïdes, font partie du groupe chimique des monoterpènes cyclopentanoïdes, comportant dix atomes de carbone, distinguable des autres iridoïdes par scission du noyau cyclopentane entre les carbones 7 et 8 (Figure 02).



**Figure 02** : Schéma représentatif de la formation des sécoiridoïdes.

Les sécoiridoïdes sont presque tous des glucosides (Figure03), c'est-à-dire, condensés avec des hétérosides d'origine glucidiques. (Plouvier *et al.*, 1971), ces composés sont retrouvés chez les végétaux supérieurs, ou elles sont impliqués principalement dans les interactions plante-animal dans la défense contre les phytophages. En effet, les sécoiridoïdes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, à savoir, anti-virales, anti-fongiques, anti-bactériennes et surtout anti-inflammatoires (Ivanovska *et al.*, 1998).



**Figure 03** : Structures des secoiridoïdes présents chez *Fraxinus angustifolia*.

Des études précédentes ont montrés que les sécoiridoïdes ont un potentiel vasodilatateur (Silva *et al.*, 2010), les ligstrosides et l'oleuropeine ont une activité anti-complément (Ivanovska *et al.*,1998), les ligstrosides encore, font office d'un bon biomarqueur de biodisponibilité (García-Villalba *et al.*, 2015).

### I.3.3.PHENYLETHANOIDES

Les phenylethanoïdes sont des types de composés phénoliques caractérisés par la présence d'un phénol conjugué à une fonction alcool pour former un phenylethanol, le tyrosol et l'hydroxytyrosol (figure 04), qui sont des précurseurs de phenylethanoïdes retrouvés chez *Fraxinus angustifolia*.

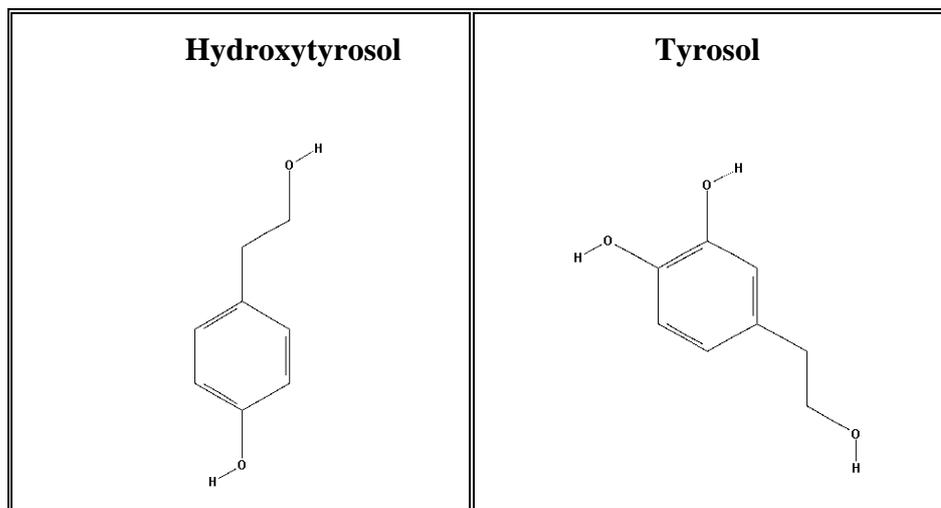
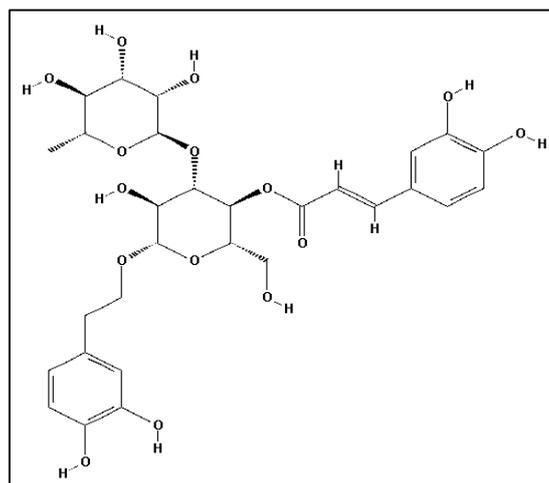


Figure 04: Structure chimique de l'hydroxytyrosol et du tyrosol [1] : (Voir références Internet).

Une grande variété de phenylethanoïdes est distribuée chez les végétaux, ayant des activités antibactérienne, antioxydant et anti tumoral (Jiménez *et al.*, 1994) mais il apparaît que le verbascoside (figure 05), est le phenylethanoïde présent chez *Fraxinus angustifolia* (Kostova *et al.*, 2007).



**Figure 05:** Structure chimique du verbascoside. [1] : (Voir références Internet).

#### **I.4.LES BASES DE LA GENETIQUE TOXICOLOGIQUE**

L'information génétique est portée par une macromolécule dont la composition est commune à tous les êtres vivants, c'est l'acide désoxyribonucléique (ADN). C'est une macromolécule composée de deux chaînes sucre-phosphate disposées en hélice l'une autour de l'autre, et qui portent, attachées, des séquences de paires de bases (**Sutherland., 2003**).

Les constituants chimiques polarisés de l'ADN font de lui une substance à fortes interactions avec les molécules qui l'entourent. A cet effet, il est très important qu'une cellule soit en mesure de protéger son matériel génétique des différentes interactions pouvant lui être nuisibles.

Par définition, une mutation est un changement permanent dans une séquence nucléotidique d'ADN, causée par une erreur de réparation, ou par une exposition à des agents mutagènes, elle peut se produire au niveau génique ou chromosomique (**Friedberg et al., 2005**). Les mutations chromosomiques ne représentent que 8% du taux global des mutations, les mutations géniques quant à elles sont les plus fréquentes avec un taux de 92% (**Popescu et Pech., 1991**).

La plupart des recherches faites sur les dommages causés à l'ADN ont été menés via l'utilisation de radiations ionisantes, de rayonnement ultraviolets, et d'agents alkylants, car ces trois facteurs sont en mesure de causer une majorité très complète des différents types de dommages causés par l'ensemble des agents physiques et chimiques susceptibles d'engendrer une génotoxicité.

Cette partie mettra en évidence, les types d'aberrations chromosomiques et chromatidiques rencontrés chez les eucaryotes, les aberrations géniques induites par les agents mutagènes sur l'ADN, y compris l'action du cyclophosphamide comme agent alkylant, et enfin, quelques tests employés pour l'évaluation de la génotoxicité d'une substance.

##### **I.4.1.ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES ET CHROMATIDIQUES**

Les aberrations sont définies comme un changement dans la structure normale et le nombre de chromosomes, elles indiquent un dommage stable et persistant (mutation) qui

représente un événement parfois, potentiellement initiateur du processus cancéreux (cancérogénèse) menant à l'apparition de néoplasmes (Iarmarcovai *et al.*, 2005). Selon Léonard, (1999), les aberrations chromosomiques et chromatidiques sont classées comme

Illustrées dans le tableau suivant :

**Tableau IV** : Schémas des aberrations chromosomiques et chromatidiques (Léonard, 1991).

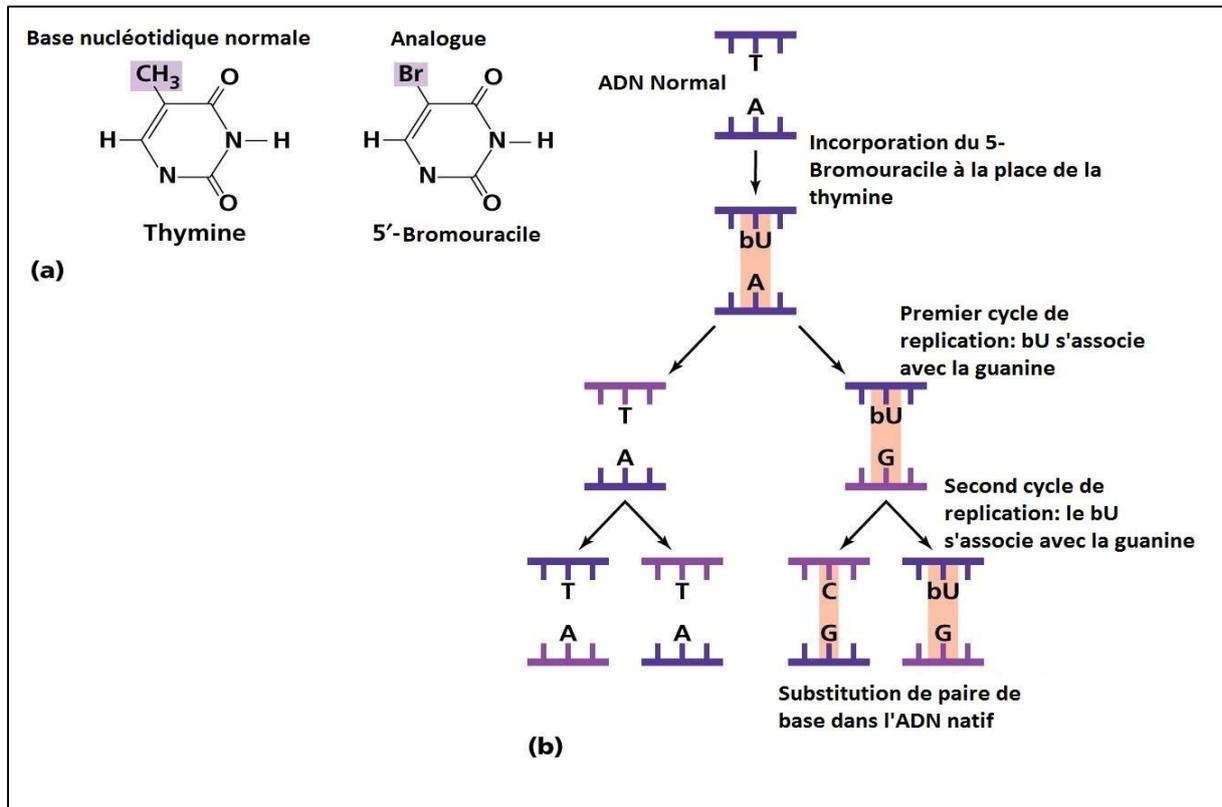
Aberrations	Définition	Schéma
Délétions terminales.	Elles se présentent sous forme de fragments chromatidiques disposés par paires.	
Délétion Interstitielles.	Fragments acentriques plus petits que les délétions terminales, résultent de deux lésions transversales très voisines.	
Anneaux acentriques.	Résultent de deux cassures assez lointaines à l'intérieur d'un chromosome, les extrémités des fragments se ressoudent pour former un anneau.	
Anneaux centriques.	Ce sont des anomalies qui résultent de coupures se produisant de part et d'autre du centromère, suivies de la soudure des extrémités.	
Inversions péricentrique.	Résultent de deux coupures situées de part et d'autre du centromère, suivies de l'inversion du segment contenant le centromère puis de son réassemblage.	
Echanges symétriques.	Ces aberrations résultent de dommages dans deux chromosomes suivis d'un recollement aberrant (transloqué)	
Echanges asymétriques.	Proviennent de dommages produits dans deux ou plusieurs chromosomes suivis d'une soudure entre les parties pourvues de centromère, il en résulte la formation de chromosome polycentrique.	
Lacune (gap)		

Fragment.	Elles sont relativement simples, elles Peuvent résulter, soit d'une lacune, d'une Cassure, ou d'un échange entre chromatides.	
Echange Chromatides sœurs.		

**I.4.2.LES MUTATIONS GENIQUES**

**I.4.2.1.REMPLACEMENT D'UNE BASE PAR UN ANALOGUE STRUCTURAL**

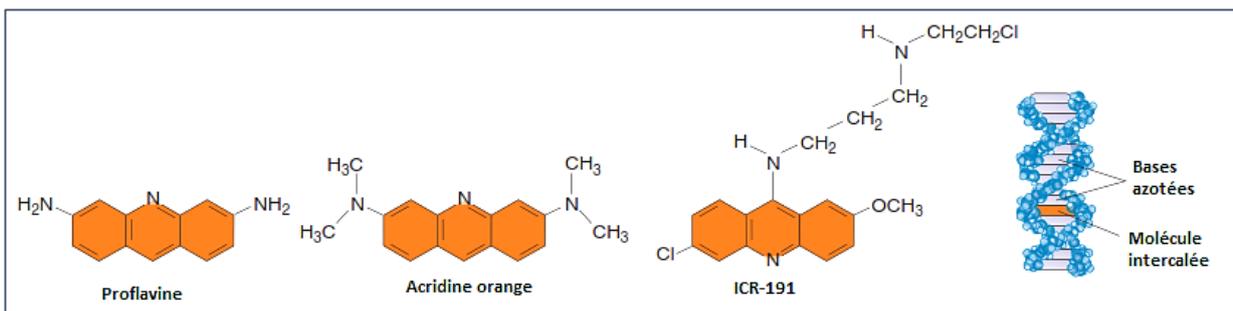
L'exemple du 5-bromouracile édifie le mieux le mécanisme qui peut conduire à une mutation de l'ADN. Ainsi, le 5-bromouracil est un analogue structural de la thymine comme illustré dans la figure 06 (a), lorsqu'il s'incorpore dans son état normal (5-BU<sup>t</sup>) dans l'ADN il se lie spécifiquement avec l'adénine, cette liaison ne constitue pas un danger pour l'ADN car les séquences nucléotidiques des brins d'ADN néoformés lors de la réplication seront identiques aux brins matriciels. Ce n'est que lorsque le 5-bromouracile se trouve dans son état rare, c'est-à-dire se comportant comme une cytosine (5-BU<sup>c</sup>), qu'il cause une mutation délétère pour l'ADN, en effet, la forme 5-BU<sup>c</sup> rare se lie spécifiquement avec la guanine et cause une transition AT→GC (substitutions de purines par des purines ou de pyrimidines par des pyrimidines) illustré dans la figure 06 (b), la séquence nucléotidique est alors mutée et la réplication de l'ADN perpétuera cette mutation génique (Watson *et al.*, 2014).



**Figure 06:** (a) La thymine et son analogue structural ; (b) Schéma de substitution de base par le 5-bromoUracile. (Traduit de l'anglais) [1] : voir références internet.

#### I.4.2.2.AGENTS INTERCALANTS

Un grand nombre d'agents intercalants sont connus pour leur grand potentiel mutagène à l'instar des proflavines, benzopyrenes, psoralènes, et l'acridine orange (Figure 07). Toutes ses molécules ont un point commun qui fait d'elles des intercalants de l'ADN, à savoir, une structure plane, avec laquelle elles produisent des dommages fonctionnels en induisant une distorsion de la double hélice et en bloquant le plus souvent la réplication de l'ADN par leur insertion entre deux paires de bases adjacentes (**Griffith *et al.*, 2012**).



**Figure 07** : Intercalation de l'acridine orange dans de l'ADN (traduit de l'anglais)

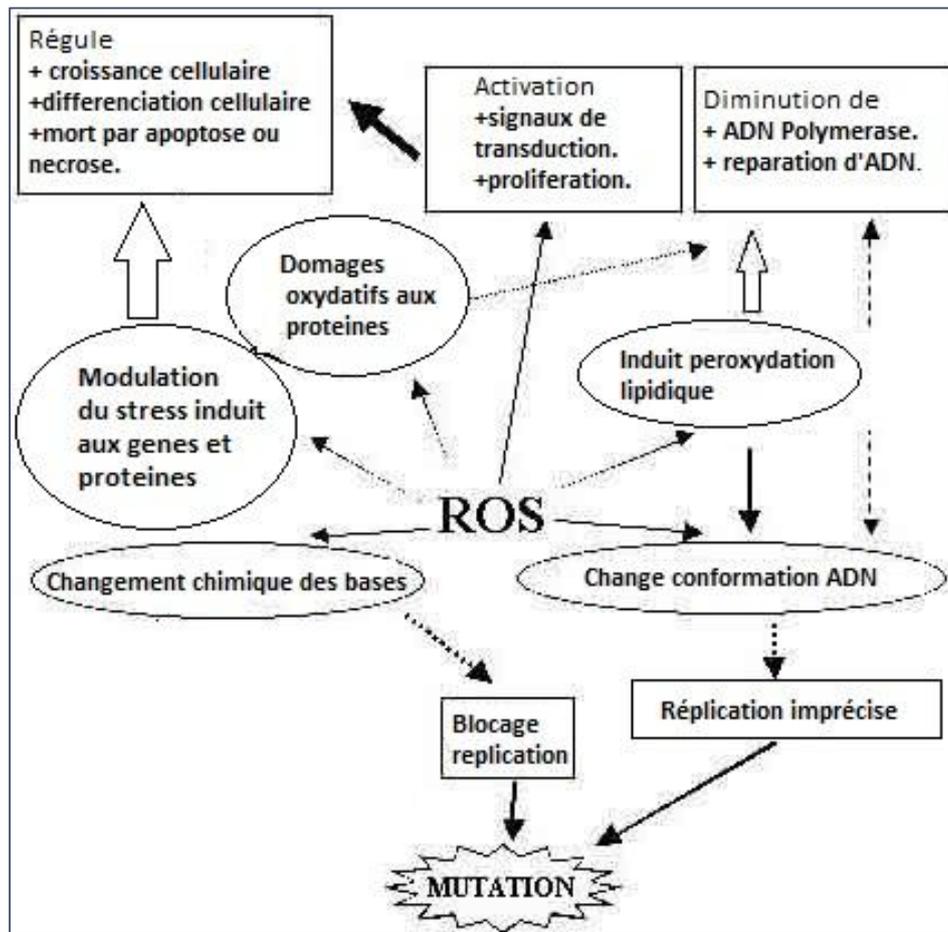
(Griffith *et al.*, 2012).

Il est à noter que, les agents intercalants peuvent produire aussi bien des additions que des délétions au niveau d'un brin néoformé issu de la réplication du brin ou l'agent intercalant s'est glissé. L'addition ou la délétion d'une ou plusieurs paires de base aura pour conséquence un décalage du cadre de lecture synonyme de pertes d'informations indispensables si la mutation a lieu dans une partie codante de l'ADN (Griffith *et al.*, 2012).

#### **I.4.2.3.RAYONS ULTRAVIOLETS**

Les rayonnements ultraviolets sont des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 100 et 400 nanomètres, selon leurs spectres d'absorption, on distingue trois types de rayons UV à savoir, les UVA, les UVB, et les UVC. Cette énergie lumineuse provient principalement des rayonnements solaires auxquels sont soumis les organismes vivants, une exposition prolongée ou aigue à ce type de rayonnement peut provoquer des mutations génétiques même si l'épiderme atténue les rayonnements de grande énergie (Sage., 1993).

Par exemple, l'apparition des mélanomes malins est en étroite corrélation avec l'activité des espèces réactives de l'oxygène (Molognoni *et al.*, 2013), et les risques de développer un cancer chez les individus atteints du *Xeroderma pigmentosum*, maladie génétique rare caractérisée par une sensibilité accrue de la peau aux rayons du soleil, sont dus à d'éventuelles apparitions de dimères de thymine au niveau de l'ADN causés par les rayons ultraviolets, notons dans le cas de cette maladie, que les risques sont liés directement au fait que les systèmes de réparations des dommages (principalement le système Nucleotid Excision Repair) sont inactivés.



**Figure 08** : Effets des dommages causés par les ROS sur la cellule (traduit de l'anglais) (Matés *et al.*, 1999).

#### I.4.2.2.AGENTS ALKYLANTS

Les agents alkylants sont des composés organiques capables d'introduire un groupement alkyle sur une molécule d'ADN. Il existe plusieurs familles d'agents alkylants à savoir, les moutardes azotées, les oxazaphosphorines, les éthylène-imines, les alkyls alcanes sulfonates, les triazènes et hydrazines, les nitroso-urées, et les organoplatines (Pourquier., 2015).

Les agents alkylants sont classés en deux types selon leur composition et leurs effets sur l'ADN, on distingue; les agents alkylants mono-fonctionnels ou simples brins, et les agents alkylants bi-fonctionnels ou doubles brins. Les mono-fonctionnels sont composés d'un seul groupement réactif et ne forment qu'une seule liaison avec l'ADN, les bi-fonctionnels par contre, sont formés de deux groupements réactifs et peuvent alors former deux liaisons, souvent dans des régions voisines, sur les deux brins d'ADN (**Connors, 1987**).

Les principaux dommages causés par les agents alkylants sur l'ADN sont; l'arrêt de la réplication; due à la formation d'adduits covalents (pontage ADN-protéine), un arrêt de la transcription au niveau du site de fixation de l'agent alkylant, des cassures d'ADN mono et double brins, et des modifications de bases azotées tels que l'alkylation des thymines et guanines par l'éthyle-méthane-sulfonate (**Tripathi et Jena, 2009**).

Les agents alkylants sont utilisés majoritairement dans les traitements anti-cancéreux puisque les dommages causés par ces agents sur l'ADN aboutissent souvent à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose, ces agents ayant la capacité de bloquer la prolifération (néoplasme) de cellules tumorales d'où leur appellation d'agents alkylants antinéoplasiques (**Schabel et al., 1978**).

#### ➤ **Le cyclophosphamide**

Le cyclophosphamide est un agent alkylant bi-fonctionnel anti-néoplasique de type oxazaphosphorine de la famille des moutardes azotées, c'est une pro-drogue métabolisée au niveau hépatique, et son action est cycle-dépendante, c'est-à-dire qu'il n'altère que les cellules en division (**Giraud et al., 2010**).

Le cyclophosphamide est indiqué dans les traitements des lymphomes hodgkiniens et non-hodgkiniens, myélomes multiples, leucémies, cancers du sein, rétinoblastomes, neuroblastomes, et cancers des ovaires. Il est également administré à faible dose dans quelques maladies auto-immunes telles que les polyarthrites rhumatoïdes, vascularite de Wegener, lupus érythémateux disséminés, et les néphropathies auto-immunes cortico-résistantes (**Madondo et al., 2015**).

Le cyclophosphamide, illustré dans la figure 09, est transformé en un produit actif appelé 4-hydroxy-cyclophosphamide via les cytochromes CYP2B6, CYP2C19, et CYP3A4 au niveau hépatique, et se retrouve en équilibre dynamique avec l'aldophosphamide. Ce dernier sera ensuite transformé en moutarde phosphoramidate et en acroléine ou, transformé par

l'aldéhyde oxydase en carboxyphosphamide puis en moutarde norazotogène (Veal *et al.*, 2016).

L'aldophosphamide est moins effectif en terme de toxicité et d'effet thérapeutique que le 4-hydroxycyclophosphamide, en effet, ce dernier est apolaire, il se diffuse plus aisément dans la cellule que son homologue (Zon *et al.*, 1984).

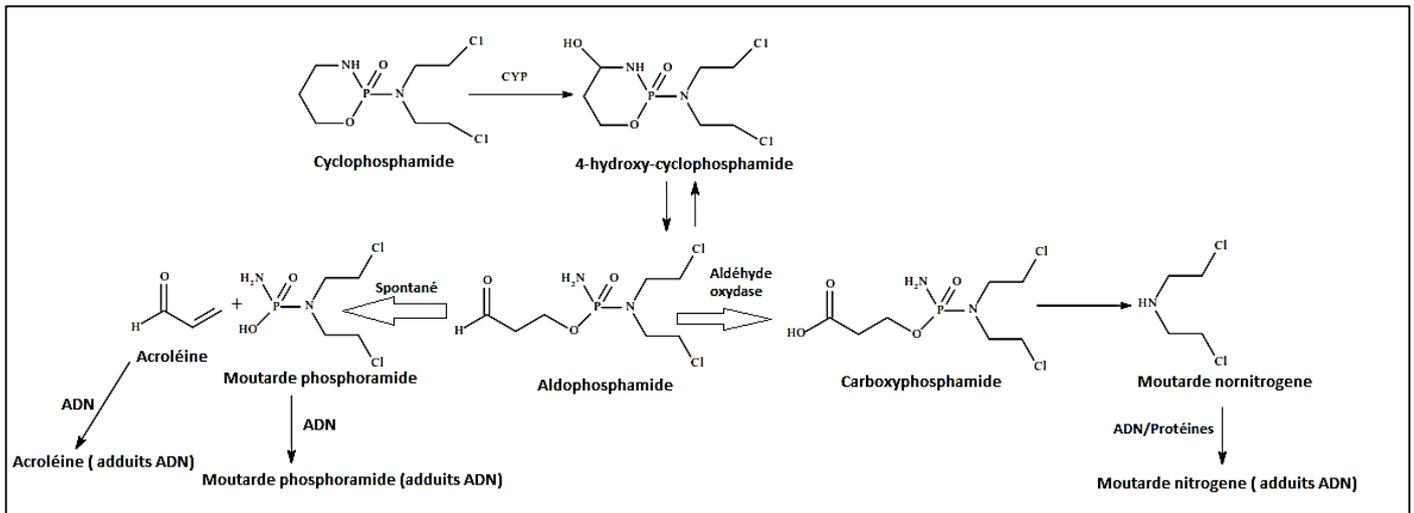


Figure 09: Dérivés métaboliques du Cyclophosphamide (traduit de l'anglais) (Khan *et al.*, 1998).

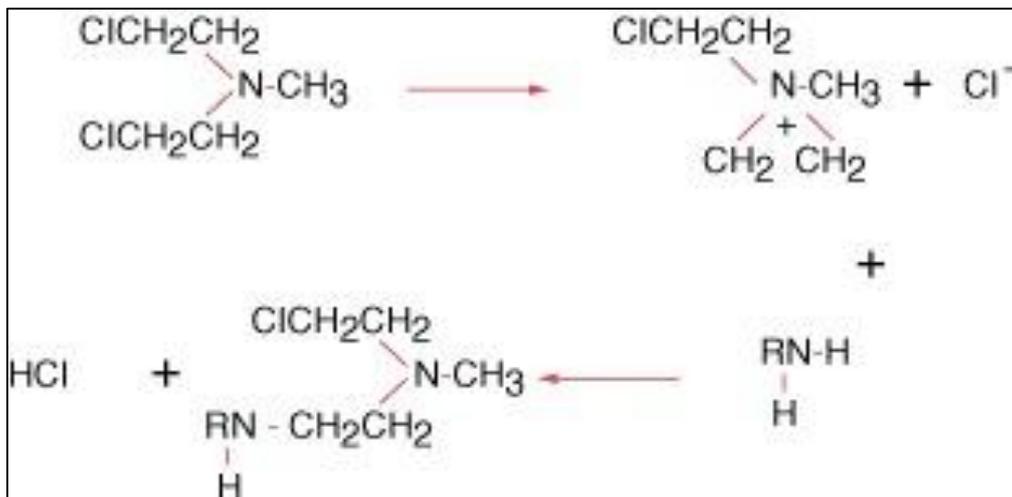


Figure 10: Mécanisme d'alkylation des moutardes azotées (Kufe *et al.*, 2003).

L'action exclusive du cyclophosphamide sur les cellules en division rend son utilisation très intéressante, tant sur son utilité dans le test des aberrations chromosomiques que sur son pouvoir mutagène. En effet, le test d'aberrations chromosomiques est un test d'analyse génotoxique à court terme, ce qui requiert l'utilisation de cellules à fortes divisions

mitotiques tels que les cellules de la moelle osseuse et d'un agent mutagène principalement cycle-dépendant, donc capable d'agir de manière imminente sur ces cellules.

Enfin, le cyclophosphamide est un agent possédant un bon potentiel mutagène *In vivo*; il a été trouvé qu'il induisait des dommages à l'ADN des cellules de la moelle osseuse des souris (**Soler-Niedziela et al., 1989**), chez les drosophiles, il induisait une aneuploïdie, et chez les humains il augmentait les risques d'aberrations chromosomiques dans les lymphocytes périphériques et les cellules de la moelle osseuse (**Hartmann et al., 1995**).

### **I.5. TESTS D'ÉVALUATION DE LA GENOTOXICITÉ**

La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques, chimiques, ou biologiques, à provoquer l'apparition de dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations irréversibles du matériel génétique, si ces lésions ne sont pas réparées. Ces agents sont qualifiés de mutagènes (**Dégremont et Cachot, 2009**).

Les tests de génotoxicité visent à évaluer l'impact d'une substance, d'une préparation, ou d'un extrait, potentiellement mutagène, en mesurant l'aptitude de ceux-ci à induire des aberrations géniques ou chromosomiques chez des bactéries ou des cellules eucaryotes (**Berthelot-Ricouet et al., 2013**).

Les tests les plus utilisés en laboratoire sont : le test de Ames, le test des comètes, le test des micronoyaux et le test des aberrations chromosomiques.

#### **I.5.1. TEST DE AMES**

Le test de Ames est un test de toxicologie génétique *in vitro* qui 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 et al., 1973**). Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant 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 testée (**Maron et Ames, 1983**).

**I.5.2. TEST DES COMETES**

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) est une méthode basée sur la microscopie fluorescente rapide et très sensible pour la détection et la quantification des lésions primaires de l'ADN, notamment les cassures de l'ADN, qui représentent une des lésions à forte probabilité d'apparition après exposition à des agents mutagènes (**Berthelot-Ricou et al., 2013**).

Le principe est simple; après lyse des membranes cellulaires et libération des noyaux, l'ADN des cellules est ensuite soumis à des conditions électrophorétiques. Compte tenu du faible voltage et ampérage, les molécules d'ADN intactes et donc trop lourdes pour avoir été déplacées vont décrire une sphère compacte, tandis que, les fragments endommagés vont migrer vers l'anode, formant une typique «queue de comète».

Les figures ainsi décrites sont alors tout à fait comparables à des comètes. La lecture au microscope à fluorescence et l'analyse d'image permet alors la quantification des effets observés (**Hovhannisyan, 2010**).

**I.5.3. TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES**

Le test d'aberration chromosomique (CA, chromosomal aberration assay) sur cellules de mammifères a été décrit par **Preston et al. (1987)**, est fréquemment utilisé pour évaluer la génotoxicité, en étudiant les dommages de l'ADN induit par divers agents chimiques et de l'environnement, et a été adopté comme indice de génotoxicité (**Alsatari et al., 2012**). Il identifie les agents qui provoquent des anomalies structurelles (cassures chromosomiques ou chromatidiques), ou encore des anomalies de nombre de chromosomes (aneuploïdie, polyploidie) (**Livingston et al., 2006 ; Tossa et al., 2014**).

Les cellules analysées sont, soit des lymphocytes isolés de sujets humains ou d'animaux (exposés *In vivo* à des substances chimiques ou préparations), ou des lignées cellulaires (exposées *In vitro* aux agents génotoxiques). Ce type de test va donc pouvoir être employé pour mesurer le potentiel génotoxique d'un composé *in vitro* ou *in vivo* (**Cimino, 2006; Kim et al., 2011; Alsatari et al., 2012**).

Le caryotype est réalisé selon les techniques cytogénétiques habituelles (**Sram et al., 2007**), en bloquant les cellules en métaphase à l'aide de la colchicine; l'analyse d'un grand nombre de métaphases est souvent requis.

Les aberrations chromosomiques indiquent un dommage stable et persistant (mutation), qui représente un événement potentiellement initiateur dans le processus qui mène à la néoplasie; la présence d'aberrations chromosomiques a d'ailleurs été corrélée avec un risque accru de survenue de cancers (**Norppa *et al.*, 2006; Boffetta *et al.*, 2007**).

Dans l'optique d'évaluer la génotoxicité/antigénotoxicité de *Fraxinus angustifolia* sur un modèle murin, ce dernier s'est avéré être le test le plus adéquat.

# *CHAPITRE II*

## *MATERIEL ET METHODES*

**II. MATERIEL ET METHODES****II.1. ANIMAUX**

Pour évaluer l'activité génotoxique/anti-génotoxique *in vivo* des extraits des écorces de *F.angustifolia*, des souris albinos (NMRI)mâles et femelles, d'un poids qui varie entre 27 et 35 g avec une moyenne d'âge de 6 ( $\pm 2$ ) semaines ont été utilisées (Figure 11).

Les souris proviennent du centre d'élevage de l'institut Pasteur d'Alger (Kouba), et l'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire d'expérimentation animale de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia. La salle est soumise à des conditions d'éclairage contrôlés (diurne : nocturne 12h/12h), et à une température ambiante ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).



**Figure 11:** Photographie originale d'une souris utilisée lors de l'expérimentation.

## II.2. MATÉRIEL VEGETAL

Les écorces de *Fraxinus angustifolia* (Figure 13) ont été récoltés à la forêt de Chemini (963m Altitude, 36°35' Latitude, 4°36' longitude) en juillet 2015 (Figure 12), elles ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière vive, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique (KIKA Labortechnik, Staufen, Germany), et ont été réduits ainsi en poudre fine de (63 $\mu$ m). Les échantillons ont été identifiés par Mr. Hacène ABDELKRIM, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El-harrach, Alger.

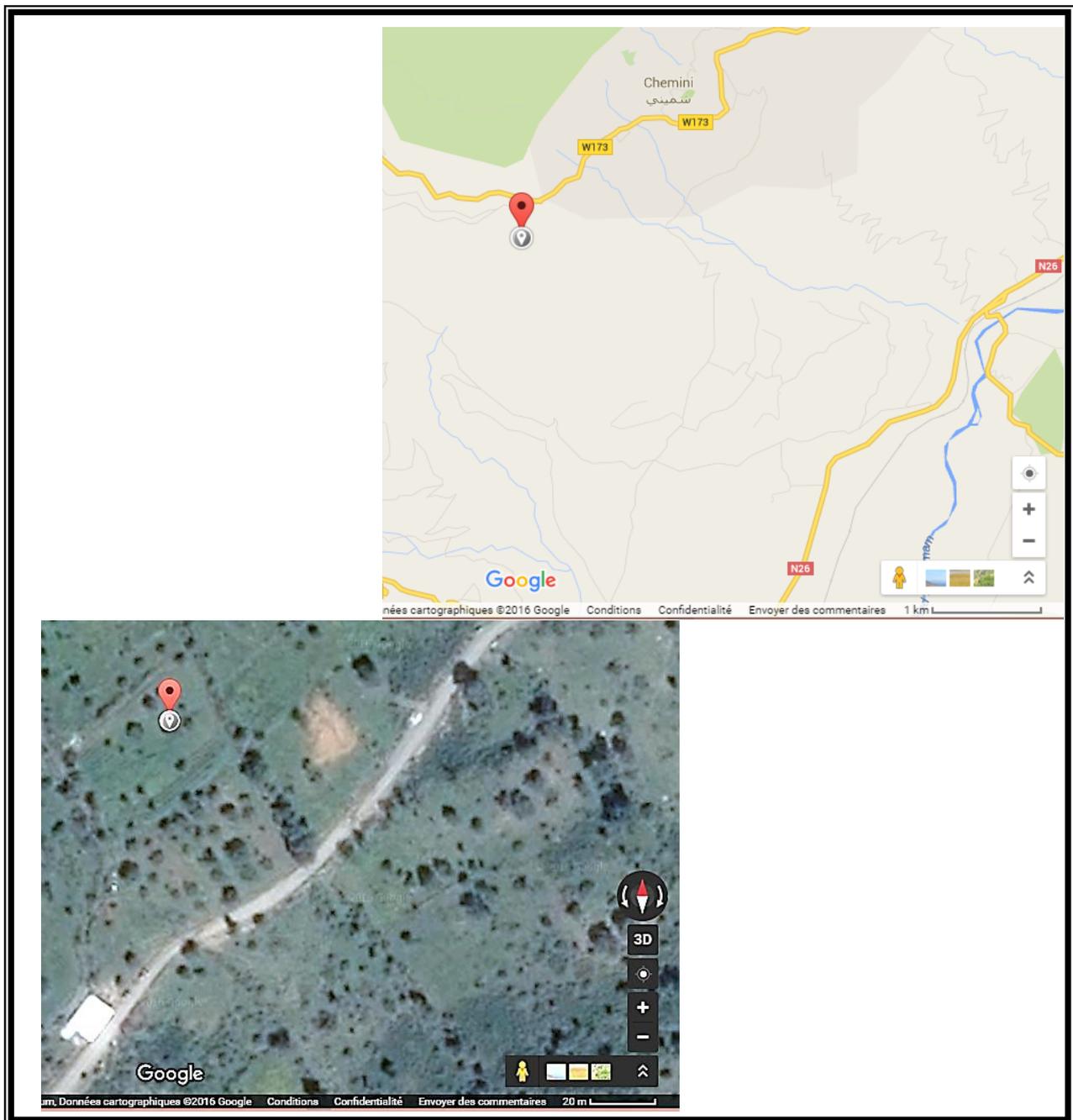


Figure12: Localisation géographique du lieu de récolte des écorces de *Fraxinus angustifolia*.



**Figure13:** Photographie originale des écorces de *Fraxinus angustifolia*.

### **II.3. PRODUITS CHIMIQUES**

Les produits utilisés pour l'extraction et le test de génotoxicité sont :

Acide acétique (Sigma Aldrich, Etats-Unis);

Carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma Aldrich, Etats-Unis);

C Chlorure de Potassium (KCL) (PRS Panreac, Espagne);

Chloroforme (Biochem Chemopharma, Québec);

Colchicine (Biochem Chemopharma, Québec);

Colorant Giemsa (Sigma Aldrich, Etats-Unis);

Cyclophosphamide monohydrate (Sigma Aldrich, Chine);

Eurokit 100ml, mounting medium for clinical diagnosis (EMMONYA BIOTECH Ltd, Bulgarie);

Ethanol 96% (Sigma Aldrich, Allemagne);

Huile à immersion (Carl Zeiss, Allemagne);

Méthanol (Biochem Chemopharma, Québec);

Xylène (Sigma Aldrich, Etats-Unis);

**II.4. PREPARATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES ECORCES DE FRAXINUS ANGUSTIFOLIA**

La poudre des écorces récupérée a été macérée dans l'éthanol (96%) dans un rapport de 1:4/P:V, pendant 12h sous agitation et dans l'obscurité. Après décantation, le surnageant obtenu a été ensuite centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes. Cette étape a été répétée deux fois et les surnageants résultant ont été mélangés et séchés à l'évaporateur rotatif (Heidolph) pour donner l'extrait sec éthanolique de l'écorce de *F.angustifolia*.

**II.5. EVALUATION DE LA GENOTOXICITE****II.5.1. ADMINISTRATION DES DOSES D'EXTRAITS AUX SOURIS**

Huit lots de males et huit lots de femelles de 6 souris chacun ont été constitués dont chaque lot correspond à un traitement particulier : (Tableau V)), et ont été gavés pendant sept jours, par différentes concentrations d'extraits d'écorce de *F.angustifolia* obtenues par dilution dans du carboxyméthyl cellulose (CMC) à 0,8%, et ce 1h30 à 2h après le retrait de l'eau et de nourriture (Figure 14).

Au 7<sup>ème</sup> jour de gavage, les lots concernant le test anti-génotoxique, ainsi que les témoins positifs ont reçu une injection intra-péritonéale de cyclophosphamide (50mg/kg) une heure après le gavage.

Le tableau ci- dessous illustre la répartition des lots et les détails des différents traitements

**Tableau V:** Tableau récapitulatif des traitements de souris.

	<b>Lot</b>	<b>Administration orale</b>	<b>Injection</b>
<b>Contrôles</b>	C- C+	CMC 0.8% CMC 0.8%	- Cyclophosphamide (50mg/kg)
<b>Tests de génotoxicité</b>	GE 250 mg/kg GE 500 mg/kg GE 1000 mg/kg	Extrait des écorces 250 mg/kg Extrait des écorces 500 mg/kg Extrait des écorces 1000mg/kg	- - - -
<b>Tests d'anti-génotoxicité</b>	AGE 125mg/kg AGE 250mg/kg	Extrait des écorces 125 mg/kg Extrait des écorces 250 mg/kg	Cyclophosphamide (50mg/kg) Cyclophosphamide (50mg/kg)



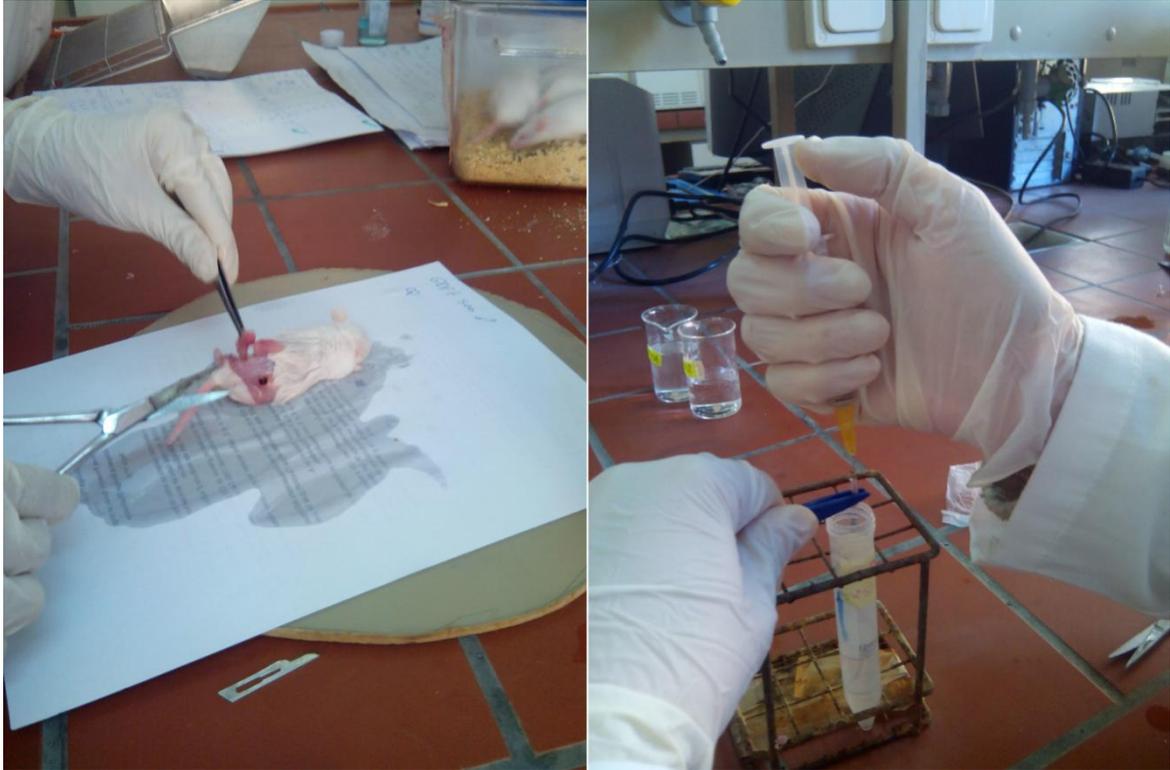
**Figure14:** Photographie originale d'un lot de souris, de gavage et d'une injection intra-péritonéale.

### **II.5.2. SACRIFICE DES SOURIS ET PRELEVEMENT DE LA MOELLE OSSEUSE**

Le 8<sup>ème</sup> jour, de la colchicine (4mg/kg) a été injectée aux souris par voie intra-péritonéale 02h avant le sacrifice, les souris ont été mises dans du chloroforme puis sacrifiées par dislocation cervicale. Les fémurs ont été rapidement excisés, et la moelle osseuse a été extraite dans des tubes contenant une solution de KCl (0.56%) pré-incubée à 37 °C. (Figure 15).

Les cellules récoltées ont été incubées à 37°C pendant 30min, puis centrifugées à 1400 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été re-suspendu dans un petit volume de KCl (0.56%) puis fixées dans 5ml de fixateur de Carnoy (ajouté goutte à goutte avec agitation manuelle).

Les tubes ont été re-centrifugés pendant 10min à 1400rpm, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension. 2ml de fixateur de Carnoy ont été ajoutés, et les tubes ont été stockés à 4 °C.



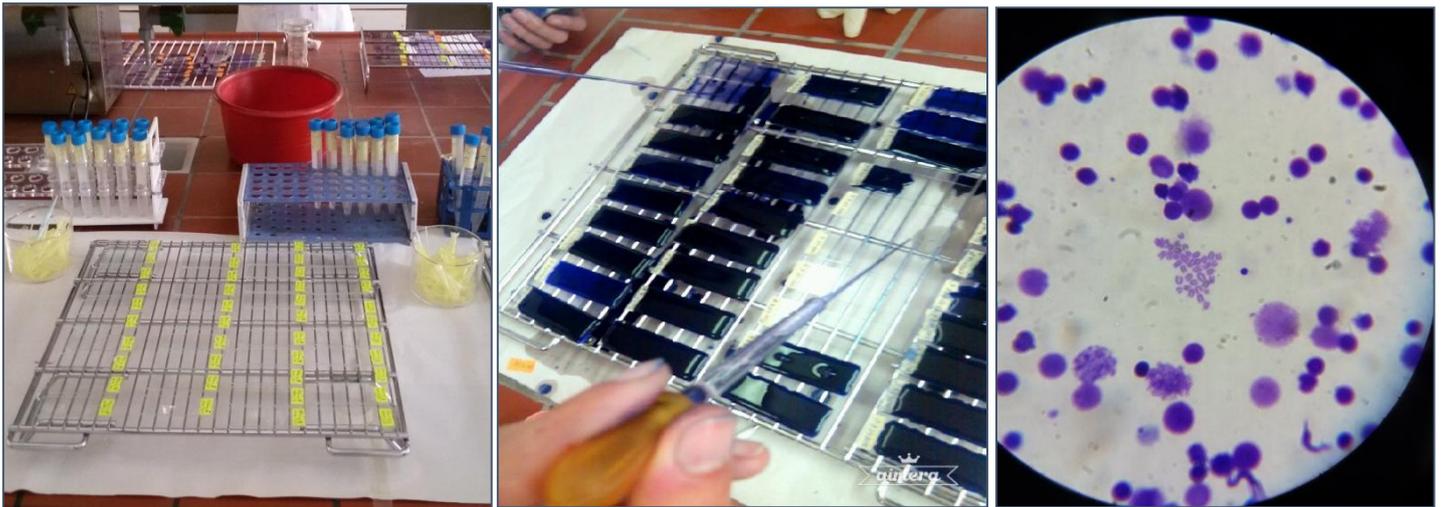
**Figure 15:** Photographie originale du prélèvement des fémurs et extraction de la moelle osseuse.

### **II.5.3. FIXATION DES CELLULES SUR LES LAMES, COLORATION, ET EXAMEN MICROSCOPIQUE**

Au 9<sup>ème</sup> jour, les suspensions réfrigérées ont été soumises à deux autres centrifugations avec changement de nouveaux volumes de fixateurs. Les derniers culots obtenus ont été re-suspendus et déposés soigneusement sur des lames préalablement préparées (étiquetées et nettoyées). Les suspensions ont été laissées séchées à l'air libre pendant 1 heure puis colorées au Giemsa (10%).

L'eurokit a été enfin utilisé pour couvrir les lames par des lamelles et conserver les échantillons pour une observation microscopique aux grossissements X40 et X100.

Toutes ces étapes sont illustrées dans la figure 16.



**Figure 16:** Photographie originale des étapes de fixation, coloration et observation des lames.

➤ **LES PARAMETRES ETUDIES**

Les observations au microscope ont impliqué, dans un premier temps le dénombrement des noyaux en interphase et les noyaux en division incluant les différents stades de division mitotique afin de calculer les indices mitotique (IM) de chaque souris, selon la formule suivante :

$$IM(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules en division}}{\text{Nombre total de cellules dénombrées}} * 100$$

Parallèlement, l'analyse d'une centaine de métaphases où les chromosomes sont bien dispersés « well spread metaphasis » a été effectuée, et le pourcentage des cellules aberrantes (PA) a été calculé selon la relation suivante :

$$PA(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules aberrantes}}{\text{Nombre total de cellules dénombrées}} * 100$$

Les aberrations recherchées et dénombrées sont les fragments, les lacunes (Gaps), les anneaux (Rings), les délétions de chromatides, les associations centromériques, les pulvérisations, et les polyploidies.

**II.6. TRAITEMENT DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES**

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  somme des écarts moyens (S.E.M) avec tukey and Dunnett comme post-test pour de multiples comparaisons versus les lots témoins négatifs et positifs. Afin d'avoir une interprétation statistique des résultats obtenus, une analyse en utilisant le test one way ANOVA (ANalysis of Variance) a été menée sur le logiciel « package GraphPadPrism 5 » pour Windows, avec un risque d'erreur de  $P < 0.05\%$ .

# *CHAPITRE III*

## *RESULTATS ET DISCUSSION*

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

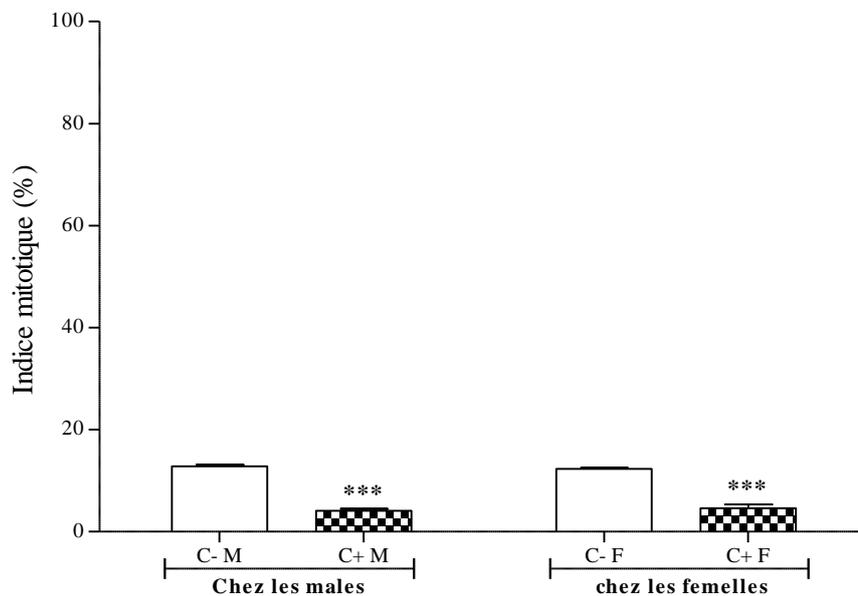
#### III.1. RESULTATS DE L'EXTRACTION

L'extraction éthanolique permet d'obtenir une large gamme de composés, tels que les polyphénols, les coumarines, les phényléthanoides, et quelques terpènes. Le rendement de l'extraction éthanolique de l'écorce de *F.angustifolia* est d'environ 10 %.

#### III.2. INDUCTION DE LA GENOTOXICITE PAR LE MUTAGENE

##### III.2.1. INDICES MITOTIQUES

Les résultats des indices mitotiques calculés pour les lots de souris traitées par le CMC (0.8%) et le CP (50mg/kg) sont représentés dans l'histogramme de la figure 17 suivante:

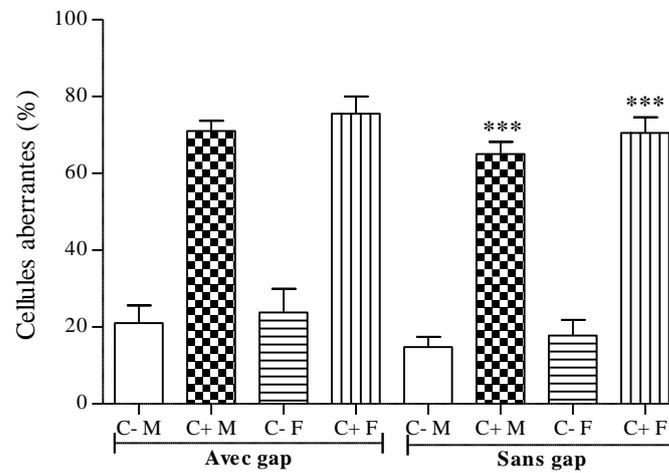


**Figure 17 :** Représentation graphique des indices mitotiques (%) des groupes témoins négatifs (CMC 0.8%) et positifs (CP 50mg/kg), mâles et femelles. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M et considérés significatifs par Dunnett post test de l'analyse One-way ANOVA. (\*\*\*)  $P < 0.001$  comparé au contrôle négatif. (n=5 pour les mâles et n=4 pour les femelles).

Les résultats de l'analyse statistique par le test de Dunnett ( $P < 0.05$ ), des contrôles positifs et négatifs ne montrent aucune différence d'indices mitotiques entre les deux sexes, néanmoins, la diminution des indices mitotiques des contrôles positifs induite par le cyclophosphamide est très hautement significative (\*\*\*)  $P < 0.001$  comparativement aux contrôles négatifs (CMC 0.8%). Ce qui indique que le CP a induit une cytotoxicité par perturbation du cycle cellulaire.

## III.2.2.POURCENTAGES DE CELLULES ABERRANTES

Les pourcentages de cellules aberrantes calculés pour les lots de souris traitées par le CMC (0.8%) et le CP (50mg/kg) sont représentés dans l'histogramme de la figure 18.



**Figure 18:** Représentation graphique des cellules aberrantes (%) des groupes témoins négatif (CMC 0.8%) et positif (CP 50mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne±S.E.M et considérés significatifs par Dunnett post test de l'analyse One-way ANOVA (\*\*\*) $P < 0.001$ ). (n=5 pour les mâles et n=4 pour les femelles).

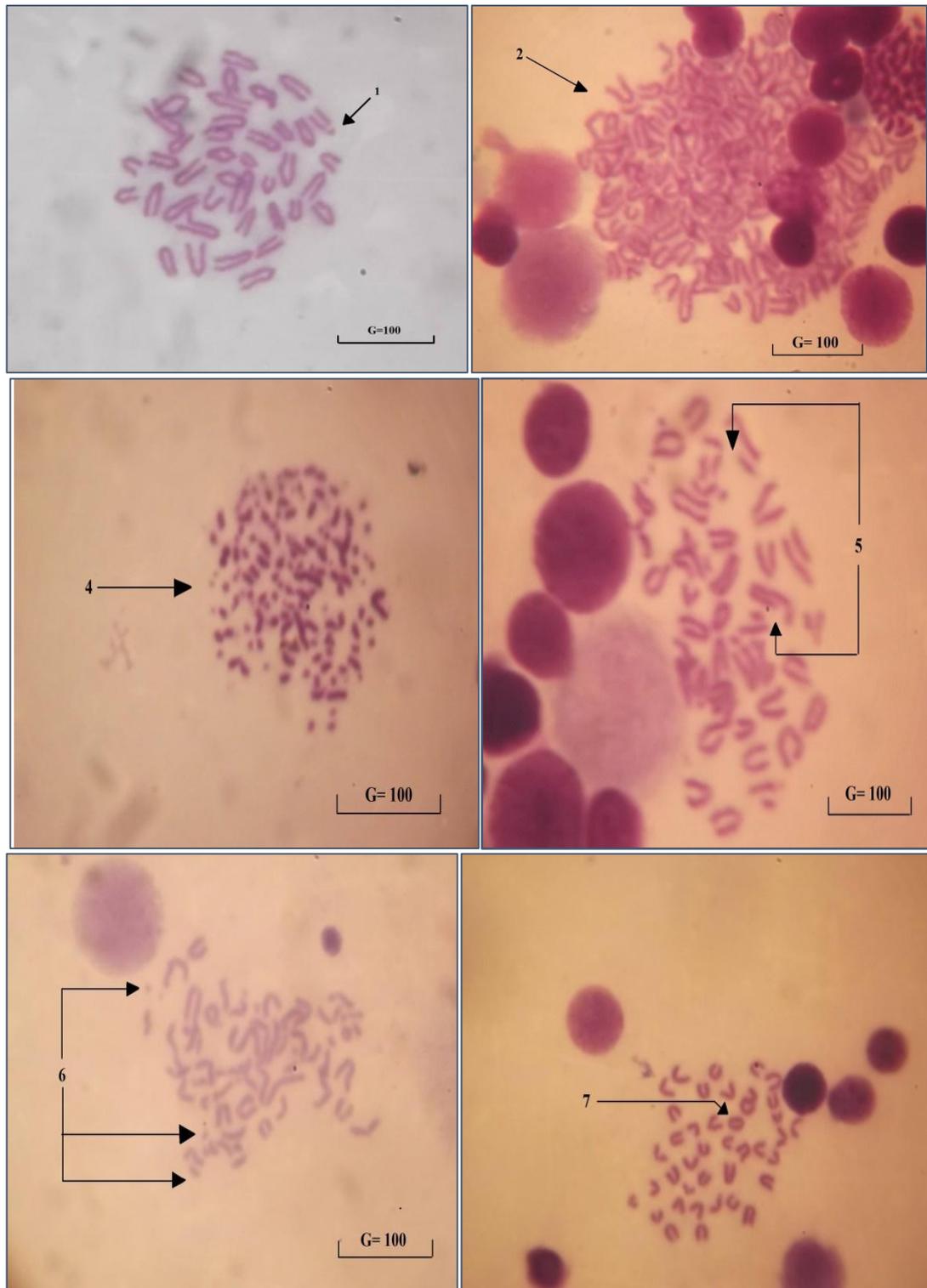
L'analyse statistique via le test Dunnett a rapporté une augmentation très hautement significative (\*\*\*)  $P < 0.001$ ) des cellules aberrantes par rapport au contrôle négatif, chez les mâles ainsi que chez les femelles (71% contre 21% pour les mâles; 75.5% contre 23.75% pour les femelles).

Les différents types d'aberrations chromosomiques détectés dans les cellules de la moelle osseuse des souris et leur abondance pour les contrôles négatifs et positifs sont rapportés dans le tableau VI et illustrés par les photographies de la figure 19.

**Tableau VI :** Types et fréquences des aberrations chromosomiques chez les lots témoins.

Traitement		Met spread	Aberrations chromosomiques						
			lacune	anneau	fragment	cassure	Asso cent	Pulvéri-sation	Poly-ploïdie
CMC	♂	100	14	5	34	13	4	0	0
		100	2	3	12	3	0	0	0
		100	16	5	9	9	4	0	0
		100	15	3	8	9	2	0	0
		72	2	2	10	3	0	2	0
	♀	100	6	6	11	14	0	0	0
		100	16	5	9	9	4	0	0
		100	35	8	164	63	13	31	0
100		16	2	3	12	3	0	0	
CYCLO	♂	100	9	17	166	12	14	22	0
		76	7	21	45	22	12	3	0
		50	20	1	70	33	4	20	2
		100	8	10	96	33	7	5	0
	♀	70	0	1	7	0	1	0	1
		100	5	2	10	1	3	0	0
		80	4	7	57	22	2	37	0
		100	59	4	152	77	8	7	2

D'après le tableau VI, une nette augmentation d'aberrations chromosomiques est observée chez les témoins traités avec le cyclophosphamide (50mg/Kg), principalement le nombre de fragment.

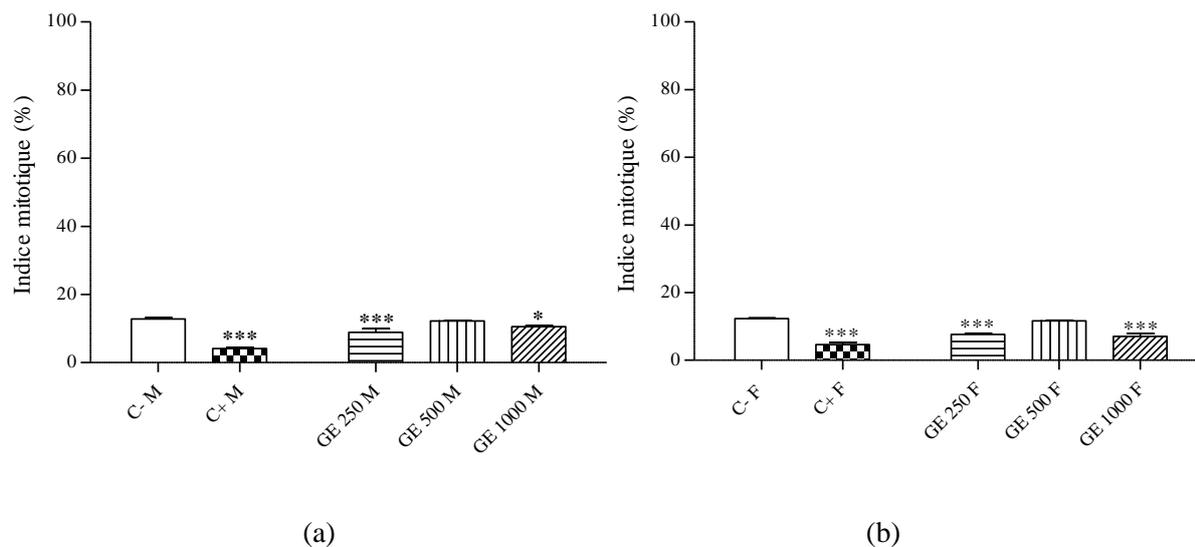


**Figure19:** Photographie originale des différents types d'aberrations chromosomiques induites par le CP, détectées lors de l'analyse des cellules de la moelle osseuse des souris sous microscope optique GX100;1: Gap (vide), 2: Polyploidie, 4: Pulverisation, 5 et 6: cassures et Fragments,7- Anneau (ring).

III.3. Evaluation de la génotoxicité des doses de l'extrait de l'écorce de *F.angustifolia*

## III.3.1. INDICES MITOTIQUES

Les résultats du calcul des indices mitotiques des cellules de la moelle osseuse de fémurs de souris traitées avec les extraits éthanoliques des écorces de *F.angustifolia* à différentes concentrations (250, 500 et 1000 mg/kg), sont illustrées dans les figure 20 (a) pour les mâles, et (b) pour les femelles.



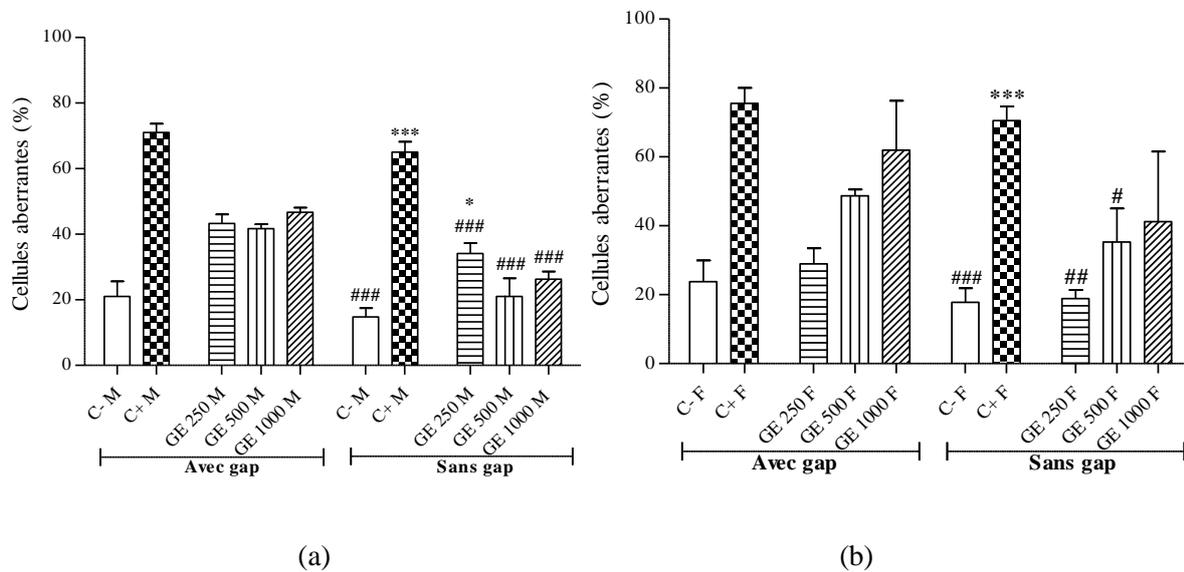
**Figure 20 :** Représentation graphique des indices mitotiques (%) de l'effet cytotoxique des différentes concentrations d'extrait éthanoliques des écorces de *Fraxinus angustifolia* (250, 500 et 1000 mg/kg) sur les cellules de la moelle osseuse des souris. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$ S.E.M (\*\*\*) comparé au contrôle négatif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunnett a été utilisé pour l'analyse statistique. (n=5 pour les contrôles mâles et n=4 pour les contrôles femelles et n=3 pour les extraits). (a) : chez les mâles, (b) : chez les femelles.

Pour les mâles, les résultats de l'analyse statistique des indices mitotiques des contrôles négatifs comparativement aux différentes concentrations de l'extrait des écorces de *F.angustifolia*, sont très hautement significatifs à 250mg/Kg, non significatifs à 500mg/Kg et significatifs à 1000mg/Kg ( $P < 0.05$ ), indiquant que à 250mg/Kg, l'écorce des racines de *F.angustifolia* serait cytotoxique.

Chez les femelles, l'analyse statistique des indices mitotiques des contrôles négatifs comparativement aux différentes concentrations de l'extrait des écorces de *F.angustifolia* sont très hautement significatifs ( $P < 0.05$ ) à 250mg/Kg et 1000mg/Kg, et non significatif à 500mg/Kg.

## III.3.2. POURCENTAGES DE CELLULES ABERRANTES

La figure 21 représente les pourcentages de cellules aberrantes (%) des mâles et des femelles chez les lots ayant servis pour l'évaluation de l'activité génotoxique des extraits d'écorce de *F.angustifolia* (250, 500 et 1000mg/Kg).



**Figure 21:** Représentation graphique des cellules aberrantes (%) de l'effet génotoxique des différentes concentrations d'extrait éthanoliques des écorces de *Fraxinus angustifolia* (250, 500 et 1000 mg/kg) chez les souris. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M et considérés significatifs par Dunnet post test de l'analyse One-way ANOVA. (\*\*\*)  $P < 0.001$  comparé au contrôle négatif. (n=5 pour les contrôles mâles, n=4 pour les contrôles femelles et n=3 pour les extraits). (a) : chez les mâles ; (b) : chez les femelles.

La comparaison ( $P < 0.05$ ) du contrôle positif aux souris traitées par les différentes concentrations de l'extraits éthanolique des écorce de *F.angustifolia* (250, 500 et 1000mg/Kg) ont présenté une réduction du pourcentage d'aberration chromosomique très hautement significative (###  $P < 0.001$ ) aux trois concentrations pour les mâles.

Les résultats de la comparaison ( $P < 0.05$ ) du contrôle positif aux souris traitées par les différentes concentrations de l'extraits éthanolique des écorce de *F.angustifolia* (250, 500 et 1000mg/Kg) ont présenté une réduction du pourcentage d'aberration chromosomique hautement significative (##  $P < 0.05$ ) à 250mg/Kg, significative (#  $P < 0.05$ ) à 500mg/Kg et non significative à 1000 mg/Kg par rapport au CP chez les femelles.

Ces résultats induisent que les extraits des écorces de *Fraxinus angustifolia* ont contré l'effet du cyclophosphamide.

Les différents types d'aberrations chromosomiques détectées dans les cellules de la moelle osseuse des souris et leur abondance pour mâles et femelles traités pour l'évaluation

de la génotoxicité des extraits des écorces de *F.angustifolia* par les différentes concentrations (250, 500 et 1000 mg/Kg) sont rapportés dans le Tableau VII.

**Tableau VII :** Tableau récapitulatif de des types et abondances des aberrations chromosomiques chez les mâles et femelles traités aux concentrations de l'extrait d'écorce de *F.angustifolia*.

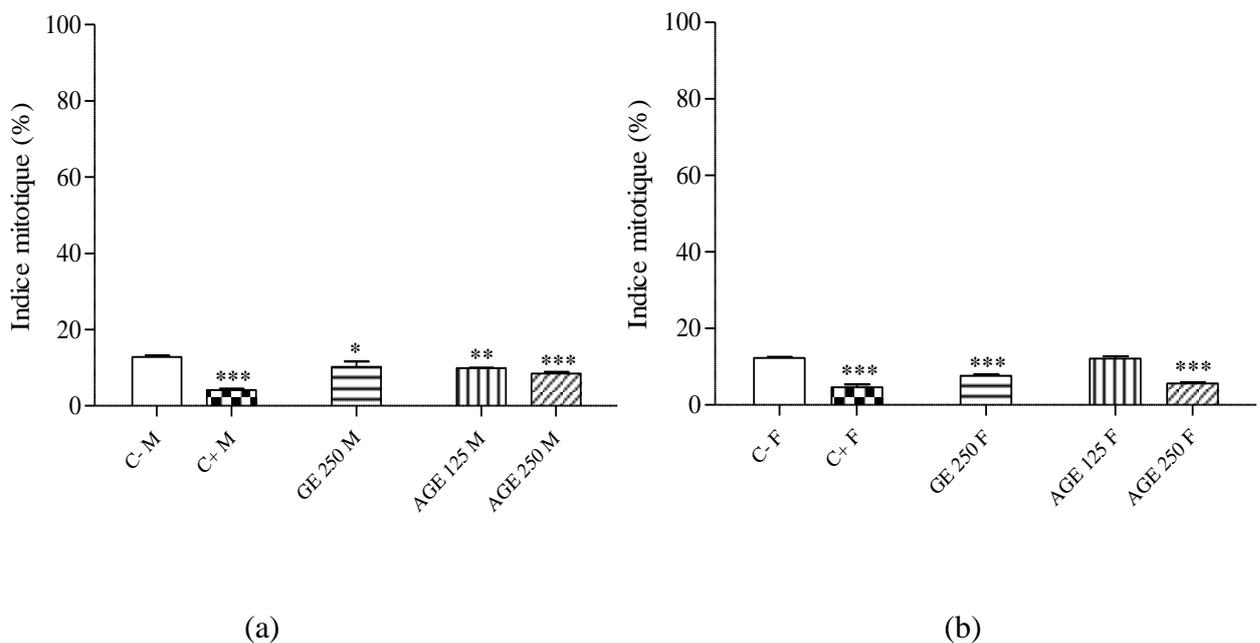
Traitement		Met spread	Aberrations chromosomiques						
			lacune	anneau	fragment	délétion	Asso cent	Pulvéri -sation	Poly- ploidie
GE 250	♂	100	11	7	60	14	4	0	0
		89	5	6	43	10	6	5	0
		100	17	5	38	11	4	3	0
	♀	70	3	1	1	4	9	0	0
		99	19	1	5	4	28	0	0
		80	7	2	0	0	19	0	1
GE 500	♂	100	34	5	54	25	7	1	0
		100	41	8	41	16	7	1	0
		100	14	8	51	24	8	0	0
	♀	100	84	3	125	40	6	4	0
		100	48	2	123	41	3	5	0
		100		7	76	25	5	3	0
GE 1000	♂	100	41	5	46	8	4	7	0
		100	39	7	69	28	8	14	0
		100	43	6	76	22	11	6	0
	♀	70	18	1	5	7	17	0	0
		100	35	4	7	8	15	0	0
		100	11	1	248	94	14	52	0

Dans le tableau VII, une certaine homogénéité des aberrations chromosomiques est observée entre males et femelles ainsi qu'aux différentes concentrations des extraits de l'écorce de *F.angustifolia* (250, 500 et 1000mg/Kg).

### III.4. EVALUATION DE L'EFFET COMBINE DE L'EXTRAIT DE L'ECORCE DE *F.ANGUSTIFOLIA* ET LE MUTAGENE

#### III.4.1.INDICE MITOTIQUE

La figure 22 représente les pourcentages des indices mitotiques (%) calculés pour les lots de souris traitées par le CMC (0.8%), le CP (50mg/kg) et les extraits de l'écorce de *F.angustifolia* (125 et 250mg/Kg).ces concentrations ont servie à évaluer l'effet antigénotoxique.



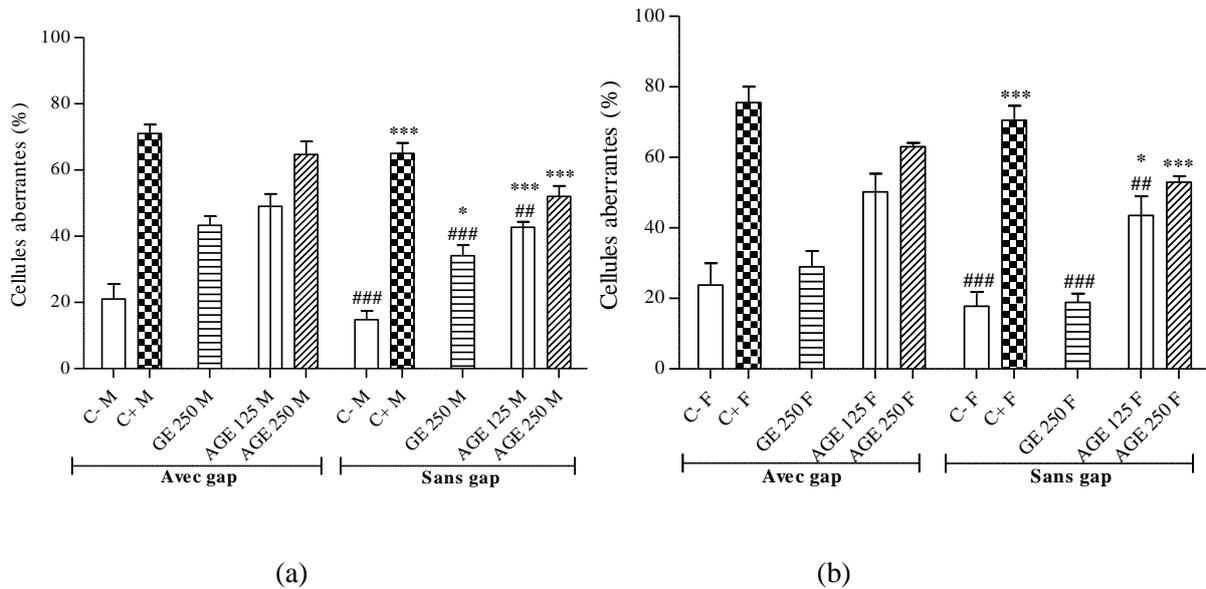
**Figure 22:** Représentation graphique des indices mitotiques (%) de l'évaluation de l'effet anti-cytotoxique des concentrations d'extrait éthanolique des écorces de *Fraxinus angustifolia* (125 et 250mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M (\*\*\*)  $P < 0.001$  comparé au contrôle négatif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunnett a été utilisé pour l'analyse statistique. (n=5 pour les contrôles et n=3 pour les extraits). (a) : chez les mâles et (b) : chez les femelles.

L'analyse du traitement combiné des lots traités par le cyclophosphamide et les extraits des écorces de *F.angustifolia* chez les mâles, a démontré une augmentation très hautement significative (###  $P < 0.001$ ) de l'indice mitotique que ce soit à 125mg/Kg ou à 250mg/Kg par rapport au contrôle positif, autrement dit, elles semblent avoir une activité anti-cytotoxique.

Les femelles ont montré une augmentation très hautement significative de l'indice mitotique à 125mg/Kg, et non significative à 250mg/Kg par rapport au contrôle positif lors du traitement combiné des extraits (125 et 250 mg/Kg) au cyclophosphamide (50 mg/Kg).

## III.4.2. Evaluation des pourcentages de cellules aberrantes

Les résultats du calcul des cellules aberrantes (%) des souris traitées par les extraits des écorces de *F.angustifolia* (125 et 250mg/Kg) combiné au cyclophosphamide (50mg/Kg) sont représentés la figure 23.



**Figure 23:** Représentation graphique des cellules aberrantes (%) de l'évaluation de l'effet anti-génotoxique des concentrations d'extrait éthanolique des écorces de *Fraxinus angustifolia* (125 et 250mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M (\*\*\*)  $P < 0.05$  comparé au contrôle négatif et (###  $P < 0.05$ ) comparé au contrôle positif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunnett a été utilisé pour l'analyse statistique. (n=5 pour les contrôles et n=3 pour les extraits). (a) : chez les mâles et (b) : chez les femelles.

L'analyse du traitement combiné des lots traités par le cyclophosphamide et les extraits des écorces de *F.angustifolia* chez les mâles, montre une diminution hautement significative du pourcentage de cellules aberrantes à 125mg/Kg et non significative à 250mg/Kg par rapport au contrôle positif. L'induction de la diminution du pourcentage de cellules aberrantes, semble indiquer une activité antigénotoxique.

L'analyse du traitement combiné des lots traités par le cyclophosphamide et les extraits des écorces de *F.angustifolia* chez les femelles via le Dunnett test, montre une diminution hautement significative du pourcentage de cellules aberrantes à 125mg/Kg et non significative à 250mg/Kg par rapport au contrôle positif.

Cette diminution du taux d'aberrations, pourrait laisser croire que la concentration de 125mg/Kg de l'extrait d'écorce de *F.angustifolia* aurait une activité antigénotoxique.

Les différents types d'aberrations chromosomiques détectées dans les cellules de la moelle osseuse des souris et leur abondance pour mâles et femelles traités pour l'évaluation de l'activité antigénotoxique des extraits des écorces de *F.angustifolia* par les différentes concentrations (125 et 250 mg/Kg) sont rapportés dans le Tableau VIII.

**Tableau VIII :** Tableau récapitulatif de des types et abondances des aberrations chromosomiques chez les mâles et femelles traités par les extraits d'écorce de *F.angustifolia* pour évaluer l'antigénotoxicité.

Traitement		Met spread	Aberrations chromosomiques						
			lacune	anneau	fragment	délétion	Asso cent	Pulvéri -sation	Poly- ploïdie
AGE 125	♂	100	19	4	69	69	1	5	2
		100	64	6	94	28	7	1	3
		100	43	3	152	64	2	5	4
	♀	70	6	1	69	32	6	1	0
		71	6	0	70	41	4	20	0
		70	11	0	65	37	5	0	17
AGE 250	♂	100	25	6	97	33	5	33	1
		100	17	7	158	42	5	21	0
		100	20	3	130	25	1	45	0
	♀	85	9	3	155	53	16	20	0
		100	11	5	81	48	17	26	1
		100	16	8	25	26	13	22	1

Comparativement au tableau VI, il a été démontré dans le tableau VIII, une diminution du nombre d'aberrations chromosomiques, sans doute suite au pré-traitement par les extraits des écorces de *F.angustifolia*.

**III.5.DISCUSSION**

Ce travail avait pour objectif de tester sur des souris albinos, par le test des aberrations chromosomiques, des extraits brutes d'écorce à des concentrations différentes en vue de l'évaluation des activités antigénotoxique et génotoxique de *F.angustifolia*.

Cette dernière est traditionnellement indiquée dans le traitement des coliques, des fièvres, des cystites, de la goutte, ou des excès d'acide urique (**Çalis et al., 1993**) de plus, diverses activités biologiques ont été découvertes chez cette plante tels qu'antibactérienne, anti-inflammatoire, et notamment anti-oxydante (**Atmani et al., 2009**).

Ses activités ont été attribuées principalement à ses métabolites secondaires majoritairement constitués de phenylethanoides à l'instar du verbascoside, de flavonoïdes à l'instar de l'acide tannique, catéchine, quercétine et rutine, et de secoiridoïdes à l'instar du ligstroside et de l'oleuropeine.

L'extraction réalisée avait pour but d'extraire principalement cette gamme de composés. Le rendement de l'extraction était d'environ 10%, un résultat semblable à celui rapporté par les travaux de (**Atmani et al., 2009; Ayouni et al., 2016**). Ce rendement relativement faible par rapport aux rendements d'extraction des feuilles peut être lié à la nature de la matrice végétale. En effet, l'extraction peut être influencée par plusieurs paramètres tels que le diamètre de la poudre, les solvants utilisés, le ratio entre solvant/échantillon, le temps et la température durant l'extraction (**Spingo et al, 2007; Xiao et al., 2009; Kim et Verpoorte, 2010**).

Dans cette étude, l'évaluation de la génotoxicité des extraits de *Fraxinus angustifolia* a été réalisée par le test des aberrations chromosomiques. C'est un test très sensible utilisée pour déterminer l'impact génétique potentiel produit par un agent mutagène sur les cellules de la moelle osseuse de mammifères(**Shelby et Witt, 1995; Meng et Zhang, 2002; Valadares et al., 2007; Nie et al., 2015**), ce test s'appuie sur le calcul de L'indice mitotique, qui caractérise le nombre total de cellules en division dans le cycle cellulaire, cet indice a été considéré par plusieurs auteurs comme étant un paramètre indicatif de la cytotoxicité(**Kovalchuk et al., 1998; Chukwujekwu et Van Staden, 2014**), et le pourcentages d'aberrations chromosomiques, ces paramètres ont été considéré comme marqueur d'instabilité génomique (**Macosco et al., 2015**).

Plusieurs études ont rapportée la cytotoxicité du cyclophosphamide (**Tripathi et al., 2008; Shukla et al., 2012**). La cytotoxicité induite par ce mutagène n'est pas due au cyclophosphamide lui-même, mais elle est principalement médiée par ses métabolites secondaires; le cyclophosphamide réagit avec les molécules par ses groupements bischloroethyl, il réagit via l'intermédiaire aziridinium, le reste de la molécule détermine les propriétés physiques de la molécule à savoir le transport, la distribution, et la réactivité aux agents spécifiques (**Connors, 1983**).

La moutarde phosphoramidate, un dérivé métabolique du cyclophosphamide, libère un atome de chlore et devient une molécule cationique ou autrement dit, une substance électrophile, elle va interagir avec l'azote numéro 7 des guanines car la guanine est la base azotée la plus nucléophile, une fois liés, la guanine sera chargée positivement, et subira une réaction d'hydrolyse spontanée, conduisant à la formation de sites apuriques, ces derniers fragilisent la structure de l'ADN et peuvent produire des cassures et fragmentations monobrins ou double brins, les cassures et fragmentations répétées sur des sites riches en guanines dans le génome pourrait expliquer l'apparition des pulvérisations, et des fréquences élevées de délétions chromatidiques et fragments, observés chez les souris ayant reçu le cyclophosphamide (**Benson et al., 1988**).

Un autre dérivé métabolique comme la moutarde nornitrogène, a été rapporté, comme étant à l'origine de recombinaisons (cross-link) (**Hemminki, 1987**).

L'acroléine, dérivé toxique issu de la transformation de l'aldophosphamide en moutarde phosphoramidate a été également rapporté comme ayant un rôle direct dans la formation d'adduits exocycliques qui durent dans le temps et influent sur la viabilité des cellules (**Wilson et al., 1991**), d'autre part, cette même acroléine agit par inhibition sur la glutathion (GSH) protéine impliquée dans la détoxification de la cellule, ceci implique l'accumulation de produits mutagènes, susceptibles d'augmenter la génotoxicité d'une cellule ou d'entraîner les cellules vers l'apoptose.

Tous ces effets induits par les dérivés métaboliques du cyclophosphamide pourraient expliquer pourquoi le cyclophosphamide diminue l'indice mitotique (12% chez les témoins négatifs, contre 4% chez les témoins positifs) et augmente la fréquence des aberrations chromosomiques (70% chez les témoins positifs, contre 20% chez les témoins négatifs) très significativement ( $P < 0.05$ ) chez les souris témoins ayant reçus cet agent.

L'effet des extraits des écorces de *F.angustifolia* sur les indices mitotiques ont été comparés à ceux des témoins. A une dose de 250mg/Kg, l'extrait a diminué l'indice mitotique de façon significative (\*\*\*) ( $P < 0.05$ ) chez les mâles comme chez les femelles, contrairement aux concentrations de 500mg/Kg et 1000mg/Kg où l'effet n'est pas prononcé. Ceci suggère, dans un premier temps, que l'extrait des écorces contient des biomolécules qui interagissent à faible dose avec des protéines impliquées dans la division cellulaire, en effet, l'action des composés peut être influencée par la dose, ceci implique qu'une dose importante induit une saturation des protéines cibles par différents types de composés inclus dans l'extrait brut, favorisant un effet inverse à celui retrouvé à faible dose, ce phénomène est appelé compétition stéréochimique (**Crozier et al., 2008**). Dans un deuxième temps, des études ont rapportés que la catéchine, jouait un rôle dans la modulation de l'activité des produits métaboliques du cyclophosphamide, par inhibition du CYP3A enzyme responsable de la détoxification du cyclophosphamide, et activation du CYP2B enzyme de biotransformation du cyclophosphamide, ceci a pour effet d'accumuler les produits toxiques du mutagène qui influent à leur tour sur l'indice mitotique ainsi que sur les pourcentages d'aberrations (**Muto et al., 2001**).

L'effet des extraits d'écorces de *F.angustifolia* sur les pourcentages de cellules aberrantes montre une augmentation dose dépendante, des pourcentages d'aberrations. Ceci serait peut-être lié à la concentration croissante des extraits en quercétine, ce composé a été rapporté comme étant un puissant agent mutagène, en effet, ce composé ne requiert, non seulement, pas une activation métabolique au niveau hépatique pour exercer son action, de plus sa métabolisation augmente son effet mutagène (**Nagao et al., 1986**), car il génère des composés appelés quercétine orthoquinones et quinones méthyles, rapportés comme étant des composés mutagéniques et pro-oxydants (**Mazumdar et al., 2011**). Il a été rapporté dans une étude que la quercétine, pouvait se fixer sur l'ADN et stabiliser sa structure, mais une liaison prolongée entre l'ADN et la quercétine conduit à la dégradation de la quercétine et la déstabilisation de la structure secondaire de l'ADN, donnant naissance aux cassures monobrins et double brins (**Alvi et al., 1986**), ce composé est rapporté également comme inhibiteur de la réplication par inhibition de la thymidylate synthase et l'ADN polymérase (**Mizushina et al., 2003 ; Hertzog et Tica., 2012**).

L'effet des extraits d'écorces de *F.angustifolia* combinés au mutagène sur l'indice mitotique, montre une légère augmentation de l'indice mitotique chez les souris administrées avec une concentration de 125 mg/Kg comparativement aux souris administrées avec

250mg/Kg, ce résultat appui d'avantage l'hypothèse d'une relation dose-effet, des molécules contenus dans l'extrait brut.

L'effet des concentrations d'extraits combinés au mutagène sur les pourcentages d'aberrations montre une diminution hautement significative des aberrations à la concentration 125mg/Kg par rapport aux témoins positifs, et une meilleure inhibition de l'effet du mutagène en comparaison avec la concentration de 250mg/Kg.

Ces résultats suggèrent que la concentration à 125mg/Kg possède une meilleure biodisponibilité que celle à 250mg/Kg, en effet, plus la dose administrée est basse, mieux elle est absorbée, et donc, la biodisponibilité augmente (**Crozier et al., 2008**). De plus, l'analyse comparative au contrôle positif des pourcentages des indices mitotiques et des cellules aberrantes chez les deux doses, montre que la dose 125mg/Kg tend mieux vers un effet anti-génotoxique plutôt que génotoxique, comparativement à la dose de 250mg/Kg.

Il est supposé que l'inhibition des aberrations chromosomiques obtenus dans cette étude a la dose de 125mg/Kg, serait dû en grande partie à la présence de phenylethanoides tels que le ligstroside, en effet, des études ont rapportés que ce composé possédait une excellente activité anti-oxydante et anti-génotoxique, car il lutterait contre la peroxydation lipidique des membranes (**Li et al., 1999**), et posséderait des propriétés de réparation de l'ADN contre les dommages produits par le stress oxydant (**Fabiani et al., 2008**).

# *CONCLUSION*

Les plantes médicinales connaissent un essor très important du fait des propriétés thérapeutiques qu'elles procurent. En effet, *Fraxinus angustifolia*, est douée d'activités biologiques, dues à ses métabolites secondaires.

Dans cet étude le test des aberrations chromosomiques *In vivo* a été utilisé afin d'évaluer la cytotoxicité ; en calculant l'indice mitotique, la génotoxicité et l'anti-génotoxicité ; en calculant le pourcentage de cellules aberrantes, d'un mutagène ainsi qu'à son action combiné aux extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à 125, 250, 500 et 1000mg/Kg.

Le traitement avec le cyclophosphamide (50mg/kg) a induit une génotoxicité et une cytotoxicité accrue, avec une différence hautement significative (\*\*\*)  $P < 0.05$ ) en comparaison avec le contrôle négatif, accompagné d'une fréquence élevée d'aberrations, notamment, des fragments et les pulvérisations.

Une activité antigénotoxique prometteuse a été obtenue avec une dose de 125 mg/kg, ceci en co-traitement avec le cyclophosphamide. Ce qui permet de conclure que l'extrait de l'écorce de *F.angustifolia* contient des substances bioactives, qui auraient empêché les effets délétères induits par l'action du mutagène, qui s'est exprimé par une hausse de l'indice mitotique accompagné d'une baisse du taux d'aberrations.

En perspectives, il serait intéressant de reconsidérer quelques paramètres qui pourraient optimiser les résultats présentés dans ce travail, à savoir, le rendement d'extraction des extraits obtenus par le type de solvants à adopter dans des études ultérieures, le choix des animaux, d'autres types de mutagènes. D'appuyer ces résultats par des tests à cibles moléculaires plus précises afin d'identifier les molécules précisément impliquées dans les mécanismes de la protection ou de l'altération du matériel génétique.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Hussein, A., Linert, W. (2015). Synthesis, spectroscopic studies and inhibitory activity against bacteria and fungi of acyclic and macrocyclic transition metal complexes containing a triamine coumarine Schiff base ligand. *Elsevier*, 141:223-232.
- Agardh, C A., Holmberg, L P. et Lundstrom, P. M. (1825). *Classes PlantarumLundæ, LiterisBerlingianis*.
- Alsatari, S., Azab, M., Khabour, F., Alzoubi, H., et Sadiq, F. (2012). Assessment of DNA damage using chromosomal aberrations assay in lymphocytes of waterpipe smokers. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 25(3), 218-224.
- Alvi, K., Rizvi, Y. et Hadi, M. (1986). Interaction of quercetin with DNA. *Bioscience reports*, 6(10): 861-868.
- Ames, N., Durston, E., Yamasaki, E. et Lee, D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8): 2281-2285.
- Ang, K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, I., Nguyen-Tân, F., Westra, W., Chung, H., Jordan, R., et al. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(1): 24-35.
- Atmani, D., Chaheer, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N. et 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, K., Atmani, D., Verpoorte, R. et Choi, H. (2016). Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *IndustrialCrops and Products*.
- Baskaran, P., Chukwujekwu, C., Amoo, O. et Van Staden, J. (2014). Anticholinesterase and mutagenic evaluation of in vitro-regenerated *Agapanthus praecox* grown ex vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(2): 271-275.
- Berthelot-Ricou, A., Perrin, J., Di Giorgio, C., de Meo, M., Botta, A. et Courbiere, B. (2013). Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. *Fertility and sterility*, 100(3): 882-888.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boffetta, P., Norppa, H., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Puskaierova, D., Znaor, A. *et al.* (2007). Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol*, 165:36-43.
- Bouarroudj, K., Tamendjari, A. *et* Larbat, R. (2016). Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*) oil. *Industrial Crops and Products*.
- Bromhead, E. F. (1838). An attempt to ascertain characters of the botanical alliances. *Edinburgh New Philosophical Journal*, 24: 408-418.
- Burgos, M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M., Seidenstein, M. E. *et* Macedo, M. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International journal for parasitology*, 37(12): 1319-1327.
- Çaliş, I., Hosny, M., Khalifa, T. *et* Nishibe, S. (1993). Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry*, 33(6): 1453-1456.
- Chaudhary, M. *et* Payasi, A. (2013). Rising antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in India. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*.
- Chen, X., Ying, X., Zhang, W., Chen, Y., Shi, C., Hou, Y. *et* Zhang, Y. (2013). The hepatoprotective effect of fraxetin on carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis by antioxidative activities in rats. *International immunopharmacology*, 17(3): 543-547.
- Çiçek, E. *et* Yilmaz, M. (2002). The importance of *Fraxinus angustifolia* subsp. *oxycarpa* as a fast growing tree for Turkey. *IUFRO Meeting on Management of Fast Growing Plantations*, 11-13.
- Cimino, M C. (2006.) Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environ Mol Mutagen*, 47:362-390.
- Connors, T A. (1987). Alkylating agents, nitrosoureas and alkyltriazenes. *Cancer chemotherapy*, (5), 30-65.
- Cronquist, A., Takhtajan, A., & Zimmermann, W. (1966). On the higher taxa of Embryobionta. *Taxon*, 129-134.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Crozier, A., Clifford, N., and Ashihara, H. (2008). Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons.
- Da, H., Gu, J., and Xiao, G. (2015). *Medicinal Plants: Chemistry, Biology and Omics*. WoodheadPublishing.
- De Rigo, D., Caudullo, G., Durrant, H., Mauri, A., San-Miguel-Ayanz, J., Birks, H., Enescu, M. (2016). *European Atlas of Forest Tree Species*.
- Dégremont, C., and Cachot, J. (2009). La Génotoxicité, quel risque pour les espèces aquatiques. *Fascicules Seine-Aval*.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F., and Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The Journal of nutrition*, 138(8), 1411-1416.
- Fentem, J. H., and Fry, J. R. (1993). Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 104(1), 1-8.
- Fox, G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, E., Quimby, W., and Smith, A. (2006). *The Mouse in biomedical research: diseases (Vol. 2)*. Massachusetts: Academic Press. 747p.
- Friedberg, E., Walker, G., Siede, W., Wood, R., Schultz, R., and Ellenberger, T. (2005). *DNA Repair and Mutagenesis*, Washington D.C: ASM Press, 1118p.
- García-Villalba, R., Tomás-Barberán, A., Faça-Berthon, P., Roller, M., Zafrilla, P., Issaly, N. et García-Conesa, T. (2015). Targeted and Untargeted Metabolomics to Explore the Bioavailability of the Secoiridoids from a Seed/Fruit Extract (*Fraxinus angustifolia* Vahl) in Human Healthy Volunteers: A Preliminary study. *Molecules*, 20(12): 22202-22219.
- Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, J., Vassal, G. et Paci, A. (2010). Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(8): 919-938.
- Griffiths, A., Wessler, S., Carroll, S. et Doebley, J. (2012). *Introduction to Genetic Analysis*. New York: Macmillan Publishers. 800p.
- Haeckel, E. (1866). Bd. *Allgemeineentwicklungsgeschichte der organismen (Vol. 2)*. G. Reimer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hartmann, A., Herkommer, K., Glück, M. et Speit, G. (1995). DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay). *Environmental and molecular mutagenesis*, 25(3): 180-187.
- Hemminki, K., Alhonen, A., Linkola, E. et Hesso, A. (1987). Kinetics of hydrolysis in vitro of nornitrogen mustard, a metabolite of phosphoramidate mustard and cyclophosphamide. *Archives of toxicology*, 61(2): 126-130.
- Hertzogi, I. et Tica, O. (2012). Molecular mechanism underlying the anticancerous action of Flavonoids. *Cur Health Sci Journ*, 38: 145-149.
- Hinsinger, D., Gaudeul, M., Couloux, A., Bousquet, J. et Frascaria-Lacoste, N. (2014). The phylogeography of Eurasian *Fraxinus* species reveals ancient transcontinental reticulation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 77: 223-237.
- Hoffmannsegg, V. et Link, F. (1809). Flore portugaise ou description de toutes les plantes qui croissent naturellement en Portugal avec figures coloriées, cinq planches de terminologie et une carte 1. Charles Frédéric Amelang, Berlin.
- Hopkins, G. (2003). *Physiologie végétale*. Bruxelles: De Boeck Université. 515p.
- Hovhannisyan, G. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular cytogenetics*, 3(1), 1.
- Iarmarcovai, G., Sari-Minodier, I., Chaspoul, F., Botta, C., De Meo, M., Orsiere, T., Bergé-Lefranc, L., Gallice, L. et Botta, A. (2005). Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. *Mutagenesis*, 20(6): 425-432.
- Ivanovska, N., Iossifova, T. et Kostova, I. (1996). Complement-Mediated Antiinflammatory Action of Extracts and Pure Secoiridoids Isolated from *Fraxinus* Species. *Phytotherapy Research*, 10(7):555-558.
- Jimenez, C. et Riguera, R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Natural Product Reports*, 11(6): 591-606.
- Khan, A., Travis, B., Lynch, F., Soini, Y., Hruszkewycz, M., Delgado, M. et Boice, D. (1998). p53 mutations in cyclophosphamide-associated bladder cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 7(5): 397-403.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kim, D., Hewage, M., Kumara, R., Piao, J., Kang, A., Cho, J. et Hyun, W. (2015). Esculetin induces apoptosis in human colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress. *Cell biochemistry and function*, 33(7): 487-494.
- Kim, K., Choi, H., and Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536-549.
- Kim, S-J., Rim, K-T., Kim, J-K., Kim, H-Y. et Yang J-S., (2011). Evaluation of the Genetic Toxicity of Cyclopentane and Ammonium Nitrate - In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Assay in Chinese Hamster Ovary Cells. *Saf Health Work*, 2:17-25.
- Kisiel, W. et Michalska, K. (2002). A new coumarin glucoside ester from *Cichorium intybus*. *Fitoterapia*, 73(6): 544-546.
- Kostova, I. et Iossifova, T. (2007). Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*, 78(2): 85-106.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Telyuk, P., Hohn, B. et Kovalchuk, L. (1998). The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415(1): 47-57.
- Kufe, W., Pollock, E., Weichselbaum, R., Bast, C., Gansler, S., Holland, F. et Frei, E. (2003). *Holland-Frei cancer medicine*. London: BC Decker. 2699p.
- Lee, I., Yun, W., Seo, I., Kim, J. et Lee, K. (2014). Scopoletin prevents alcohol-induced hepatic lipid accumulation by modulating the AMPK–SREBP pathway in diet-induced obese mice. *Metabolism*, 63(4): 593-601.
- Leonard, A. (1990). *Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques* : Mont-Royal, Québec. Masson. 306p.
- Li, X., Xin, D., Li, H., Lu, F., Tong, W., Gao, N. et Chan, K. M. (1999). Effect of verbascoside on decreasing concentration of oxygen free radicals and lipid peroxidation in skeletal muscle. *Acta pharmacologica Sinica*, 20(2): 126-130.
- Livingston, GK., Falk, RB. et Schmid, E. (2006) Effect of occupational radiation exposures on chromosome aberration rates in former plutonium workers. *Radiat Res*, 166:89-97.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Macosko, Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M. *et* Trombetta, J. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 161(5): 1202-1214.
- Madondo, T., Quinn, M. *et* Plebanski, M. (2016). Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer treatment reviews*, 42: 3-9.
- Maron, M. *et* Ames, N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3):73-215.
- Matés, J. *et* Jiménez, F. (1999). Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience*, 4: 339-345.
- Mazumdar, M., Giri, S. *et* Giri, A. (2011). Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721(2): 147-152.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M. *et* Jia, Z. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, 35(1): 121-133.
- Mizushima, Y., Ishidoh, T., Kamisuki, S., Nakazawa, S., Takemura, M., Sugawara, F. *et* Sakaguchi, K. (2003). Flavonoid glycoside: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase  $\alpha$  and a new carrier for inhibitor-affinity chromatography. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(2): 480-487.
- Molognoni, F., de Melo, M., da Silva, T. *et* Jasiulionis, G. (2013). Ras and Rac1, frequently mutated in melanomas, are activated by superoxide anion, modulate Dnmt1 level and are causally related to melanocyte malignant transformation. *PLoS one*, 8(12), e81937.
- *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 479(1): 197-206.
- Muto, S., Fujita, I., Yamazaki, Y. *et* Kamataki, T. (2001). Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450.
- Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T., Shimizu, M., Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T. *et al.* (1981). Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environmental mutagenesis*, 3(4): 401-419.
- Nagy, M., Spilková, J., Vrchovská, V., Kontšeková, Z., Šeršeň, F., Mučaji, P. *et* Grančai, D. (2006). Free radical scavenging activity of different extracts and some

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

constituents from the leaves of *Ligustrum vulgare* and *L. delavayanum*. *Fitoterapia*, 77(5): 395-397.

- Nie, W., Tsai, H., Asadpour, R., Blancon, C., Neukirch, J., Gupta, G. et Wang, L. (2015). High-efficiency solution-processed perovskite solar cells with millimeter-scale grains. *Science*, 347(6221): 522-525.
- Niu, X., Wang, Y., Li, W., Zhang, H., Wang, X., Mu et Yao, H. (2015). Esculin exhibited anti-inflammatory activities in vivo and regulated TNF- $\alpha$  and IL-6 production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages in vitro through MAPK pathway. *International immunopharmacology*, 29(2): 779-786.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, IL., Hagmar, L., Stromberg, U., Rossner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy S. et al. (2006) Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*, 600:37-45.
- Plouvier, V. (1968). Relation between coumarinfraxin and heteroside in some botanical groups. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences Serie D*, 267(22), 1883.
- Plouvier, V., and Favre-Bonvin, J. (1971). Les iridoïdes et séco-iridoïdes: Répartition, structure, propriétés, biosynthèse. *Phytochemistry*, 10(8): 1697-1722.
- Popescu, P., and Pech, A. (1991). Une bibliographie sur la translocation 1/29 de bovins dans le monde (1964-1990). *Ann Zootech*, 40: 271-305.
- Pourquier, P. (2011). Agents alkylants. *Bulletin du Cancer*, 98(11): 1237-1251.
- Prabakaran, D., and Ashokkumar, N. (2012). Antihyperglycemic effect of esculetin modulated carbohydrate metabolic enzymes activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 4(4):776-783.
- Preston, R., Dean, J., Galloway, S., Holden, H., McFee, F., and Shelby, M. (1987). Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 157-165.
- Qu, H., Zhang, Y., Chai, X. et Sun, W. (2012). Isoforsythiaside, an antioxidant and antibacterial phenylethanoid glycoside isolated from *Forsythia suspensa*. *Bioorganic chemistry*, 40: 87-91.
- Rababah, M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K. et Yang, W. (2010). Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. *Journal of food science*, 75(7): C626-C632.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, K. et Lefkowitz, J. (2012). Molecular mechanism of  $\beta$ -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 179.
  - Sage, E. (1993). Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochemistry and photobiology*, 57(1): 163-174.
  - Schabel M., Trader, W., Laster R., Corbett, H. et Griswold P. (1978). cis-Dichlorodiammineplatinum (II): combination chemotherapy and cross-resistance studies with tumors of mice. *Cancer treatment reports*, 63(9-10): 1459-1473.
  - Shelby, D. et Witt, L. (1995). Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests. *Environmental and molecular mutagenesis*, 25(4): 302-313.
  - Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Bronze, M., Coelho, V. et Boas, V. (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y aceites*, 61(2): 157-164.
  - Siqueira, R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Nunes, S., Salbego, C., Elisabetsky, E. et Netto, A. (2004). Neuroprotective effects of Ptychopetalumolacoides Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life sciences*, 75(15): 1897-1906.
  - Soler-Niedziela, L., Ong, T., Krishna, G., Petersen, M. et Nath, J. (1989). Sister-chromatid exchange studies on direct-and indirect-acting clastogens in mouse primary cell cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 224(4):465-470.
  - Sram, RJ., Rossner, P., Beskid, O., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Solansky, I. et Albertini RJ. (2007). Chromosomal aberration frequencies determined by conventional methods: Parallel increases over time in the region of a petrochemical industry and throughout the Czech Republic. *Chem Biol Interact*, 166:239-244.
  - Srivastava, J., Lambert, J., and Vietmeyer, N. (1996). *Medicinal plants: An expanding role in development* (Vol. 320). World Bank Publications.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sutherland, B. (2003). DNA Science: A First Course. By David A Micklos and Greg A Freyer; with David A Crotty. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. *The Quarterly Review of Biology*, 78(4).
- Tossa, P., Roguet, T., Thoren, C. et Piotrowski, A. (2014). Potentiel génotoxique des nanomatériaux: où en est la recherche?. *Environnement, Risques & Santé*, 13(2): 113-122.
- Tripathi, N. et Jena, B. (2009). Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. *Chemico-biological interactions*, 180(3): 398-406.
- Veal, G., Cole, M., Chinnaswamy, G., Sludden, J., Jamieson, D., Errington, J., Boddy, A. et al. (2016). Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer*, 55: 56-64.
- Wallander, E. (2008). Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*, 273(1-2): 25-49.
- Wallander, E. (2012). Systematics and floral evolution in Fraxinus (Oleaceae). *Belgische Dendrologie Belge*, 2012: 39-58.
- Wang, C., Pei, A., Chen, J., Yu, H., Sun, L., Liu, F. et Xu, X. (2012). A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of neurochemistry*, 121(6): 1007-1013.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. et Losick, R. (2014). *Molecular biology of the gene*, 7th edition, New York: Cold Spring Harbor Press, 911p.
- Wilson, L., Foiles, G., Chung, L., Povey, C., Frank, A. et Harris, C. (1991). Detection of acrolein and crotonaldehyde DNA adducts in cultured human cells and canine peripheral blood lymphocytes by <sup>32</sup>P-postlabeling and nucleotide chromatography. *Carcinogenesis*, 12(8): 1483-1490.
- Xiao, H., Tang, C., Xiao, H., Liu, X. et Liu, C. (2009). Identifying the change in atmospheric sulfur sources in China using isotopic ratios in mosses. *Journal of Geophysical Research* 114.
- Zhao, L., Zou, B., Lin, S., Shi, G. et Zhu, B. (2007). Anti-apoptotic effect of esculin on dopamine-induced cytotoxicity in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neuropharmacology*, 53(6): 724-732.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhao, Q., Yin, F., Liu, Y., Mao, X. et Su, H. (2013). Anti-hepatitis B Virus Activity of 8-epi-Kingiside in *Jasminum officinale* var. *grandiflorum*. *Chinese Herbal medicines*, 5(1): 53-57.
- Zon, G., Ludeman, M., Brandt, A., Boyd, L., Ozkan, G., Egan, W. et Shao, L. (1984). NMR spectroscopic studies of intermediary metabolites of cyclophosphamide. A comprehensive kinetic analysis of the interconversion of cis- and trans-4-hydroxycyclophosphamide with aldophosphamide and the concomitant partitioning of aldophosphamide between irreversible fragmentation and reversible conjugation pathways. *Journal of medicinal chemistry*, 27(4):466-485.

### **RÉFÉRENCES INTERNET:**

- Cummings benjamin, (2006), Pearson education, Prince George's community college, [en ligne]. <http://academic.pgcc.edu/>. (Consulté le 08.05.2016).
- Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003-2016. *Inventaire National du Patrimoine Naturel* [en ligne]. <https://inpn.mnhn.fr>. (Consulté le 05.05. 2016).
- PubChem, Open Chemistry Database, National center for biotechnology information [en ligne]. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Consulté le 11.05.2016).

## Résumé :

*Fraxinus angustifolia* est un arbre de la famille des oléacées traditionnellement réputé pour ses vertus thérapeutiques, il est souvent utilisé pour soigner les problèmes d'ordre gastrique et urinaires.

L'utilisation de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* comme matrice végétale dans ce travail a pour but d'étudier l'activité génotoxique et antigénotoxique de ses extraits à différentes doses (125, 250, 500 et 1000 mg/Kg), pour une meilleure connaissance du mode d'action de ces composés, et l'impact que peuvent avoir ces derniers sur la cellule et son matériel génétique.

La méthode utilisée pour élucider l'activité de cette plante est le test des aberrations chromosomiques, c'est un test qui requiert l'utilisation de souris albinos auxquels sont administrés quotidiennement pendant sept jours, des doses variables d'extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, l'intérêt de cette méthode étant de lier du mieux possible l'effet que pourrait avoir ces extraits sur l'Homme, à partir de l'observation de ces effets sur des mammifères.

Les résultats de l'étude ont montré une activité antigénotoxique à faible doses, notamment une meilleure activité à une dose de 125mg/Kg par rapport à une dose légèrement plus élevée de 250mg/Kg, et une activité génotoxique à partir de 500mg/Kg.

Enfin, l'étude réalisée a permis d'ouvrir un champ d'investigation important pour l'étude des mécanismes par lesquels les biomolécules affectent la stabilité du génome.

**Mots clés:** *Fraxinus angustifolia*, génotoxique, cyclophosphamide, aberrations chromosomiques, souris

## Abstract:

*Fraxinus angustifolia* is a tree of the Oleaceae family traditionally famous for its therapeutic virtues, it is often used to cure gastric and urinary problems.

The use of the bark of *Fraxinus angustifolia* as vegetable matrix in this work is to study the genotoxic and anti-genotoxic activity of its extracts with various doses, in order to understand the mode of action of compounds, and the impact which is the latter can have on the cell and its genetic material.

The method used to elucidate the activity of this plant is the test of the chromosomal aberrations, it is a test which requires the use of albinos mice to which are managed daily during seven days, variable doses of extracts of the bark of *Fraxinus angustifolia*, the benefit of this method isto linkthe effect as well as possible that could have these extracts humans, starting from the observation of these effects on mammals.

The results of the study showed an anti-genotoxic activity with low dose, in particular a better activity with an amount of 125 mg/kg compared to an amount slightly higher of 250 mg/kg, and a genotoxic activity from 500 mg/kg.

The study carried out made it possible to open an important field of investigation for the study of the mechanisms by which the biomolécules affect the stability of the genome.

**Key words:** *Fraxinus angustifolia*, genotoxic, cyclophosphamide, chromosomal aberrations, mice.