

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 71/D3C/2017

N° de série : 05/BioA/2017

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle

Option : Physio toxicologie

Thème de Recherche

**L'effet protecteur des extraits des plantes
Helianthemum confertum et *Helianthemum
ruficomum* vis-à-vis de la toxicité induite par la
Doxorubicine : Etude *in vitro* et *in vivo***

Présentée par : DJEBBARI Radja.

Devant le jury :

Président :	Laalaoui Korichi	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine.
Directrice de thèse :	Zama Djamila	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine.
Examinatrice :	Dahamna Saliha	Professeur	Université Ferhat Abbas Sétif.
Examineur :	Khennouf Seddik	Professeur	Université Ferhat Abbas Sétif.
Examineur :	Abdenmour Cherif	Professeur	Université Badji Mokhtar Annaba.

Année universitaire : 2017 - 2018

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse.

*Mes sincères remerciements vont à mon encadreur : Madame **ZAMA Djamila** ; professeur à l'université de Constantine, pour les conseils judicieux et constants qu'elle m'a prodigués tout au long de ce travail, pour sa disponibilité et son indulgence qui m'ont permis de mener à bien cette étude, qu'elle trouve ici l'expression de mes plus profonds respects et toutes mes grâces.*

*Mon respect et reconnaissance sont adressés à Monsieur **LALAOUI Korichie** ; professeur à l'université de Constantine, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*J'exprime mes remerciements à Monsieur **ABDENNOUR Cherif** ; professeur à l'université d'Annaba, qui m'a fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinateur.*

*J'exprime mes remerciements à Madame **DAHAMNA Saliha** ; professeur à l'université de Sétif, qui ma faite l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinatrice.*

*J'exprime également mes remerciements à Monsieur **KHENNOUF Seddik** ; professeur à l'université de Sétif, qui m'a fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinateur.*

*Mes remerciements au professeur **Ibrahim Demirtas** de m'avoir accueillie au Plant Research Laboratory, Département de chimie, Université Çankiri Karatekin, Uluhazi Campus, Türkiye. Grâce à lui, j'ai réalisé des nouvelles expériences par les quelles j'ai renforcé mes résultats.*

*Je remercie également l'équipe de laboratoire de biochimie et surtout le chef de service Mr **CHETTAH Adlan** au niveau de l'EPH de la daïra de Bir Hadad-Sétif.*

En fin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et mon remerciement :

Docteur Amel Amrani, Docteur Nassima Boubekri, Docteur Somia Lassed, Khadidja Bekhouche, Aïcha Latreche.

Un simple merci n'est pas suffisant à ma sœur Amina Maya Lahneche, qui m'a toujours soutenue, encouragée et conseillée dans toutes les situations que j'affronte. On partage beaucoup de moments ensemble qui sont gravés dans nos cœurs pour la vie.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

*À vous, mes très chers parents, sans qui je ne serai pas arrivée jusque-là ; j'ai énormément de chance de vous avoir. Je dois à mes parents d'avoir contribué à ma passion des sciences ; ils ont nourri ma curiosité et ont participé à mon goût pour la biologie. Cette thèse est aussi le fruit de leurs multiples sacrifices. Un énorme merci à maman **Nadia**, pour son amour inconditionnel, son support même dans les moments difficiles, source de mon courage et de ma détermination. Grâce à elle, tout est possible ; les mots sont bien petits pour exprimer mon admiration. Papa **Ammar**, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. Je te remercie d'être toujours près à me donner sans compter et sans limite. J'espère que j'ai pu vous rendre fiers de moi.*

*À ma sœur **Imen** et sa petite **Razan** et son mari **Mohammed Amin**, mes frères **Mohamed** et **Oussama**, ma grand-mère **Yamina**, je dois ma force, source de mon inspiration et de mon bonheur.*

*À ma petite famille : mon mari **Abd el djalil** qui a toujours été d'un immense soutien. Merci pour ton sourire de tous les jours et de m'avoir fait réagir dans les moments où il le fallait. En espérant que nos chemins se croisent encore longtemps, voire toujours...*

*À mon petit **Djoud** qui j'adore, le meilleur cadeau que la vie m'a apporté.*

*Merci à tous les membres de ma famille maternelle surtout mon cousin **Mohamed Debbache**, ma famille paternelle pour leur soutien continu de proche et de loin qui m'a encouragé le long de mes études. Grâce à vos prières, je suis arrivée là.*

Et tous ceux que j'oublie ...

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALT	Alanine Transaminase (GPT/ Glutamate Pyruvate Transaminase)
ANT	Anthracyclines
AST	Aspartate Transaminase (GOT/ Glutamate Oxaloacetate Transaminase)
ATP	Adenosine triphosphate
CAT	Catalase
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
COX	Cyclooxygénase
CYP	Cytochrome P
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DOX	Doxorubicine
DOXOL	Doxorubicinol
DPPH	Di Phényle PicrylHydrazyle
EGC	Epigallocatechin
eNOS	Synthase Endothéliale d'Oxyde Nitrique
ERN	Espèce Réactive de l'azote
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfide
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO·	Radical hydroxyl
HOCL	Hypochlorite
IGF	Indicator Growth Factor
iNOS	OxydeNitrique Synthase inductible
LDH	High Density Lipoprotein
LDL	Low Densite Lipoproteine
LPO	Lipoxygénase

MAP	Mitogen-Activated Protein
MDA	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF-KB	Nuclear factor (NF)-KB
NO	Monoxyded'azote
NO ₂	Dioxyded'azote
NOS	Oxyde Nitrique Synthase
O ₂ ^{·-}	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
ONOOH	Nitroperoxyde
PBS	Phosphate Buffer Solution
RL	Radicaux Libre
RO [·]	Radicale aloxyle
ROO [·]	Radicale peroxyde
ROOH	Hydroperoxyde
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Super Oxyde Dismutase
TBA	Thio Barbiturique Acide
TBARs	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Tri choloro acetic
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale
TrxR	Thio Rédoxine
UV	Ultra-violet
VIT	Vitamine
8-OH2DG	8-hydroxy-2' deoxyguanosine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Induction de la cancérogenèse via l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B induite par le stress oxydatif.....	6
Figure 2 : Structure de la doxorubicine, épirubicine, donوروبicin, idarubicin.....	10
Figure 3 : Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop (changement de position des molécules d'un feuillet de la bicouche à l'autre).....	11
Figure 4 : Métabolisme hépatique de la doxorubicine.....	12
Figure 5 : Interaction dans l'ADN et stabilisation de l'enzyme topoisomerase II.....	14
Figure 6 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine.....	19
Figure 7 : Schématisation des différentes phases du processus de peroxydation des lipides..	20
Figure 8 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	21
Figure 9 : L'homéostasie oxydative cellulaire. Interrelation entre le statut oxydant et le stress oxydant.....	22
Figure 10 : La structure chimique de la vitamine E (α -tocopherol).....	25
Figure 11 : Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique.....	25
Figure 12 : La structure chimique de la vitamine C (acide ascorbique).....	26
Figure 13 : Illustration schématique des voies principales d'induction des anthracyclines et la production de stress oxydatif par la catalysation du fer.....	27
Figure 14 : Mécanisme de toxicité cardiaque de la doxorubicine dans les cardiomyocytes...	31
Figure 15 : Mécanismes cellulaires responsables de l'apoptose accrue dans les myocytes cardiaques par la doxorubicine.....	33
Figure 16 : La structure chimique des différents types des flavonoïdes.....	36
Figure 17 : Le métabolisme des flavonoïdes.....	39
Figure 18 : Antioxydant mécanisme de défense de catéchines.....	41
Figure 19 : Le genre <i>Helianthemum</i> (Cistaceae).....	42
Figure 20 : Protocole de l'extraction de la plante <i>H. confertum</i>	46
Figure 21 : Protocole de l'extraction de la plante <i>H. ruficomum</i>	47
Figure 22 : Principe du dosage du malondialdéhyde.....	54
Figure 23 : Principe de dosage du glutathion.....	55
Figure 24 : La teneur en phénols totaux des deux extraits butanolique des plantes <i>H. ruficomum</i> et <i>H. confertum</i>	58

Figure 25 : La teneur en flavonoïdes des deux extraits butanolique des plantes <i>H. ruficomum</i> et <i>H. confertum</i>	59
Figure 26 : Pouvoir anti radicalaire des extraits butanolique des plantes <i>H. confertum</i> et <i>H. ruficomum</i> à différentes concentrations (IC50).....	60
Figure 27 : l'activité anti radicalaire de radicale DPPH' de l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> et la vitamine C.....	60
Figure 28 : l'activité anti radicalaire de radicale DPPH' de l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> et la vitamine C.....	61
Figure 29 : L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique (MDA) des deux extraits butanolique des plantes <i>H. confertum</i> et <i>H. ruficomum</i> à différentes concentrations (IC50).....	62
Figure 30 : l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (MDA) de l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> et la vitamine C.....	63
Figure 31 : l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (MDA) de l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> et la vitamine C.....	63
Figure 32 A : L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> sur la ligne cellulaire HT29 (2,5X10 ⁴ cell / well).	65
Figure 32 B : L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> sur la ligne cellulaire HT29 (2,5X10 ⁴ cell / well).....	65
Figure 33 A : L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> sur la ligne cellulaire HeLa (2,5X10 ⁴ cell/well).....	66
Figure 33 B : L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> sur la ligne cellulaire HeLa (2,5X10 ⁴ cell/well).....	66
Figure 34 : Effet de la doxorubicine (10mg/kg) et l'extraits butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur la concentration sérique des aminotransferases AST et ALT.....	67
Figure 35 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur le taux du cholestérol et triglycéride chez les déférents groupes.....	68
Figure 36 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur le taux d'MDA dans le foie et les reins chez les déférents groupes.....	69
Figure 37 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur le taux d'MDA dans le cœur chez les déférents groupes.....	70
Figure 38 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur le niveau de GSH dans le foie et les reins chez les déférents groupes.....	71
Figure 39 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur le niveau de GSH dans le cœur chez les déférents groupes....	72

Figure 40 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur l'activité de GPx dans le foie et les reins chez les déférents groupes.....	73
Figure 41 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur l'activité de GPx dans le cœur chez les déférents groupes.....	74
Figure 42 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur l'activité de catalase du foie et du rein chez les déférents groupes.....	75
Figure 43 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante <i>H. confertum</i> (50, 100mg/kg) sur l'activité de catalase dans le cœur chez les déférents groupes.....	76
Figure 44 : Observation microscopique des coupes histologiques du foie des rats.....	79
Figure 45 : Observation microscopique des coupes histologiques du rein des rats.....	82
Figure 46 : Effet de la Doxorubicine (15mg/kg), l'extraits butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur la concentration sérique des aminotransférase AST et ALT.....	83
Figure 47 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur le taux du cholestérol chez les déférents groupes.....	84
Figure 48 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur la concentration d'urée et de la créatinine dans le plasma chez les déférents groupes.....	85
Figure 49 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité de l'enzyme LDH dans le plasma chez les déférents groupes.....	86
Figure 50 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur le taux d'MDA dans le foie et les reins chez les déférents groupes.....	87
Figure 51 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur le taux d'MDA dans le cœur chez les déférents groupes.....	88
Figure 52 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur le niveau de GSH dans le foie et les reins chez les déférents groupes.....	89
Figure 53 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur le niveau de GSH dans le cœur chez les déférents groupes.....	90
Figure 54 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante <i>H. ruficomum</i> (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité de GPx dans le foie et les reins chez les déférents groupes.....	91

Figure 55 : Influence de l'administration de DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité de GPx dans le cœur chez les différents groupes.....92

Figure 56 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50,100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité de catalase dans le cœur chez les différents groupes.....93

Figure 57 : Influence de l'administration de DOX (10mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité de catalase dans le cœur chez les différents groupes.....94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Médicaments les plus utilisés pour la chimiothérapie.....	8
Tableau 2 : Principaux systèmes de production des ROS.....	17
Tableau 3 : Classification systématique des deux plantes <i>H. confertum</i> et <i>H. ruficomum</i>	43

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Première partie : Synthèse bibliographique

I- Les Cancers.....4

1. Définition.....4

2. La cancérogenèse.....4

2.1 Les agents cancérogènes.....4

2.1.1 Agents génotoxique.....4

2.1.2 Infection virale.....5

2.1.3 Perturbation hormonal.....5

3. Les 3 étapes de l'oncogenèse.....5

4. Méthodes conventionnelles de traitement contre tous les cancers.....7

4.1. Chirurgie.....7

4.2. Radiothérapie.....7

4.3. Immunothérapie7

4.4 Chimiothérapie.8

II. Doxorubicine et toxicité9

1. Historique.9

2. La doxorubicine.....9

3. Pharmacologie.....10

3.1 Structure moléculaire.....10

3.2 Pharmacocinétique.....11

4. Principaux mécanismes d'action.....13

5. Toxicité de doxorubicine.....14

II.1 Doxorubicine et stress oxydatif.....15

1. Le stress oxydant.....15

2. Les espèces réactives de l'oxygène et leur origine.....15

2.1. Les radicaux libres oxygénés.....	15
2.2. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	17
3. Les espèces réactives de l'oxygène et ses effets cellulaires ; implication en pathologie.....	18
3.1. Dommages de l'ADN.....	18
3.2. Peroxydation lipidique.....	19
3.3. Oxydation des protéines.....	20
4. Les antioxydants.....	22
4.1 Les systèmes endogènes enzymatiques.....	22
4.2 Les systèmes endogènes non enzymatiques.....	24
4.3. Les systèmes exogènes antioxydants.....	24
5. Les anthracyclines et stress oxydant.....	26
III. Effets secondaires majeurs de traitement à la doxorubicine.....	28
1. Toxicité cardiaque.....	28
1.1 Principaux mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	28
1.2 Apoptose cellulaire induite par les anthracyclines.....	31
2. Hépatotoxicité induite par la doxorubicine.....	33
3. Néphrotoxicité induite par la Doxorubicine.....	33
IV : Polyphénols, Flavonoïdes.....	34
1. Définition.....	34
2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	37
3. Biodisponibilité des polyphénols.....	37
3.1 Le métabolisme des flavonoïdes.....	38
4. Activités biologiques des flavonoïdes.....	39
4.1 Activité antioxydante.....	40
4.2 Activité antimicrobienne.....	40
4.3 Propriétés antimutagènes / anti cancérigènes.....	40
4.4 Activité anti-inflammatoire.....	40
4.5 Activité Hépatoprotective.....	41
4.6 Activité biologique des extraits <i>H. confertum</i> et <i>H. ruficomum</i>	41
5. Description botanique du genre <i>Helianthemum</i>	42

5.1 Les espèces <i>Helianthemum confertum</i> et <i>ruficomum</i>	42
5.2 Classification botanique des deux plantes.....	43
5.3 Principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Helianthemum</i>	43
5.4 Activité biologique du genre <i>Helianthemum</i>	43

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

I. Matériels et Méthodes.....	45
1. Matériel végétal et l'étude phyto-chimique.....	45
1.1 Préparation des extraits.....	45
2. Etude phyto-chimique.....	48
2.1. Détermination de la teneur totale des deux extraits en phénols.....	48
2.2 Détermination de la teneur totale des deux extraits en flavonoïdes.....	48
2.3 Evaluation de pouvoir antiradicalaire (DPPH).....	48
2.4 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO).....	49
2.5 Etude de l'effet des extraits des plantes sur des lignes cellulaires cancéreuses <i>in vitro</i>	50
3. Expérimentations animales.....	51
3.1 Effet préventif de la plante <i>Helianthemum confertum</i> sur la toxicité induite par la doxorubicine (10mg/kg).....	51
3.2 Effet préventif de la plante <i>Helianthemum ruficomum</i> sur la toxicité induite par la doxorubicine (15mg/kg).....	52
3.2.1 Dissection des rats et prélèvement du sang et des organes.....	52
3.2.2 Préparation d'homogénat et du cytosol.....	52
3.2.3 Evaluation biochimique et mesure des paramètres de stress....	53
3.2.3.1 Dosage de TGO et TGP au niveau du plasma.....	53
3.2.3.2 Dosage de cholestérol.....	53
3.2.3.3 Les triglycérides.....	53
3.2.3.4 Dosage de l'urée.....	53
3.2.3.5 Dosage de la créatinine.....	53
3.2.3.6 Dosage de MDA au niveau d'homogénat.....	54
3.2.3.7 Dosage de glutathion (GSH).....	54
3.2.3.8 Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxidase (GPx).....	55
3.2.3.9 Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	55

3.2.3.10 Dosage de protéine total.....	56
3.2.4 Etude histologique.....	56
3.2.5 Etude statistique.....	57
II. Résultats et discussion.....	58
II.1. Résultats et discussion de l'étude expérimentale <i>in vitro</i>.....	58
1. Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.....	58
2. Evaluation du pouvoir anti radicalaire.....	59
3. Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	61
4. L'effet des extraits des plantes sur des lignes cellulaires cancéreuses <i>in vitro</i>	64
II.2. Résultats et discussion de l'étude expérimentale <i>in vivo</i>.....	67
2.1. L'Effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante <i>Helianthemum confertum</i> vis-vis la toxicité aiguë induite par la doxorubicine (10mg/kg).....	67
2.1.1. L'effet des différents traitements sur les marqueurs biochimiques.....	67
2.1.1.1. Les enzymes transaminase AST et ALT.....	67
2.1.1.2. L'effet des différents traitements sur le taux du cholestérol et les triglycérides.....	68
2.1.2. L'effet des différents traitements sur le statut oxydant.....	69
2.1.2.1. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) dans le foie et les reins.....	69
2.1.2.2. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) dans le cœur.....	70
2.1.3. L'effet des différents traitements sur le statut antioxydant.....	71
2.1.3.1. L'effet sur le glutathion réduit (GSH) du foie et des reins.....	71
2.1.3.2. L'effet sur le taux du GSH du cœur.....	72
2.1.3.3. L'Effet sur l'activité de la GPx du foie et des reins.....	73
2.1.3.4. L'effet sur l'activité de la GPx du cœur.....	74
2.1.3.5. L'effet sur l'activité de catalase du foie et des reins.....	75
2.1.3.6. L'effet des différents traitements sur l'activité de la catalase du cœur.....	76
2.1.4. Etude histologique.....	76
2.1.4.1. Au niveau du foie.....	76
2.1.4.2. Au niveau du rein.....	80
2.2 L'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante <i>Helianthemum ruficomum</i> (50 et 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) vis-à-vis de la toxicité aiguë induite par la doxorubicine (15mg/kg).....	83
2.2.1. L'effet des différents traitements sur les marqueurs biochimiques.....	83

2.1.1.1 Les enzymes transaminases (AST et ALT).....	83
2.2.1.2 L'effet sur le cholestérol.....	84
2.2.1.3. L'effet sur la concentration sérique de l'urée et la créatinine.....	85
2.2.1.4. L'effet sur l'activité enzymatique du LDH dans le plasma.....	86
2.3 L'effet des différents traitements sur le statut oxydant.....	87
2.3.1. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) du foie et des reins.....	87
2.3.2. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) du cœur.....	88
2.4 L'effet des différents traitements sur le statut antioxydant.....	89
2.4.1. L'effet sur le GSH du foie et des reins.....	89
2.4.2. L'effet sur le GSH du cœur.....	90
2.4.3. L'effet sur l'activité de la GPx du foie et des reins.....	91
2.4.4. L'effet sur l'activité de la GPx du cœur.....	92
2.4.5. L'effet sur l'activité de catalase du foie et des reins.....	93
2.4.6. L'effet sur l'activité de catalase du cœur.....	94
2.4. Discussion de l'étude expérimentale <i>in vivo</i>	95
Conclusion générale.....	103
Références bibliographiques.....	104
المخلص	119
Résumé.....	120
Abstract.....	122
Annexes.....	123

Introduction

La doxorubicine (DOX), est un antibiotique anthracycline largement utilisé comme agent anticancéreux. En dépit de son efficacité antitumorale élevée, son utilisation dans la chimiothérapie clinique est limitée en raison de la diversité de ses effets toxiques, notamment rénale, hépatique, hématologique, testiculaire et surtout la toxicité cardiaque qui se termine finalement par une cardiomyopathie et une insuffisance cardiaque. (Ahmed *et al.*, 2017).

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité induite par les anthracyclines. Il a été reporté que les radicaux libres de l'oxygène (RLO) sont supposés à être un facteur clé dans la toxicité de la DOX et les événements contrôlant cette blessure oxydative sont largement appréciés. (Mohammad *et al.*, 2014). En effet, la plupart des études mettent en jeu le rôle du stress oxydatif dans ce processus qui est induit par la formation des RLO découlant de la structure chimique de la DOX ayant tendance à générer des espèces réactives de l'oxygène durant la métabolisation du médicament (Yarmohmmadia *et al.*, 2017).

Au cours des dernières décennies, et malgré la découverte des nouveaux composés en chimie de synthèse, les sources naturelles restent le principal fournisseur de nouveaux médicaments et des nouvelles structures chimiques. Nous assistons donc à un regain de la phytothérapie surtout pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes qui ont montré des propriétés biologiques antioxydantes intéressantes (Gergiev *et al.*, 2014).

En effet les plantes médicinales peuvent être source de nouvelles molécules médicamenteuses. Cependant, l'usage des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé. Les polyphénols sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les ROS par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène, mais aussi, en chélatant les ions des métaux de transition. Plusieurs plantes contenant des composés antioxydants ont montré un effet protecteur dans la cardiotoxicité induite par la DOX sans réduire leur efficacité thérapeutique (Teixeira *et al.*, 2017). En outre, il y a un intérêt croissant pour l'utilisation des antioxydants naturels comme une stratégie de protection contre les problèmes cardio-vasculaires (Dutta *et al.*, 2013). Les polyphénols constituent un vaste ensemble de composés chimiques répandus chez tous les végétaux. Dans une même plante, leur distribution peut varier selon le tissu ou l'organe envisagé ; leur teneur peut subir également des variations en relation avec les saisons ou l'état de différenciation des cellules. Les flavonoïdes qui sont l'un des constituants de ces plantes

Introduction

médicinales sont des substances naturelles qui acquièrent diverses propriétés pharmacologiques et des applications thérapeutiques. De plus, les flavonoïdes ont la capacité de moduler la toxicité induite par la DOX (Xiaoliang *et al.*, 2017).

C'est dans cette optique que cette thèse s'inscrit. Car, ces dernières années, l'attention s'est focalisée sur des substances d'origine végétale pouvant influencer une multitude de processus biochimiques tels que la synthèse des protéines, la modulation des facteurs de croissance, la prolifération des cellules malignes, la différenciation cellulaire et l'adhésion cellulaire. Le présent travail est consisté à évaluer l'effet protecteur des extraits butanoliques des plantes *Helianthemum confertum* et *Helianthemum ruficomum* vis-à-vis de la toxicité aigüe induite par la doxorubicine. Cette étude a pour but d'élucider et comprendre le rôle de ces constituants. Et plus précisément, si les flavonoïdes de ces plantes peuvent protéger les organes cibles de cette toxicité. En évaluant leurs capacités antioxydantes et les effets sur la peroxydation lipidique et les réserves de glutathion. Ainsi, notre étude a pour but d'évaluer l'effet biologique de ces deux extraits butanoliques *in vitro*, par l'étude de leurs rôle antioxydants (teste de DPPH, peroxydation lipidique, anti cancéreux), et l'évaluation de taux des phénols et flavonoïdes.

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Les Cancers

1. Définition

Il n'existe pas de définition simple du mot cancer, mais on peut le définir comme une maladie générale de l'organisme correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. De plus, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant en le détruisant puis de migrer à distance pour former des métastases (Bodin, 2005 ; Carole, 2011).

Le cancer est une maladie intrinsèque de la cellule, contrairement à de nombreuses maladies qui sont la conséquence du développement au sein de notre organisme d'un agent venu de l'extérieur (virus, bactéries, parasites), le cancer provient du fait que certaines de nos propres cellules ont perdu la capacité de contrôler leur prolifération et ont réussi à échapper aux mécanismes de surveillance qui, dans ces circonstances, les conduiraient normalement à la mort. Les cellules cancéreuses ne cessent de se diviser ; devenues immortelles et insensibles aux signaux venus de l'extérieur, elles se multiplient à l'infini, essaient et finissent par envahir l'organisme entier (Gunzburg, 2000).

2. Cancérogenèse

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qu'est l'aboutissement d'une série de transformations pouvant se dérouler sur une période de plusieurs années. La cancérogenèse est donc un processus complexe à plusieurs étapes qui nécessite conjointement l'activation d'oncogènes dominants et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, menant donc une cellule de l'état sain à un état précancéreux et, finalement, à un stade précoce de cancer (Pincemail *et al.*, 1999 ; Gunzburg, 2000).

2.1. Les agents cancérogènes

La survenue d'un cancer dépend de multiples facteurs tant individuels (génétiques, comportementaux) qu'environnementaux.

2.1.1. Agents génotoxique

Selon la classification du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), au moins 22 agents et mélanges d'agents chimiques sont des cancérogènes reconnus, alors qu'un nombre équivalent de produits chimiques sont très probablement eux aussi. En plus de ces produits chimiques, des médicaments, des pesticides, des contaminants physiques (rayonnement ionisant, UV) et biologiques (virus de l'hépatite B ou C, virus d'Epstein-Barr) sont reconnus pour leur pouvoir cancérogène (Gagnon *et al.*, 2005).

✓ **Agents physique**

Dans l'environnement général, les facteurs cancérigènes qui ont le plus d'effet sur la santé de la population sont le rayonnement ultraviolet (solaire) (Gagnon *et al.*, 2005).

Les données cliniques, épidémiologiques et expérimentales attestent sans ambiguïté du rôle fondamental des radiations ultraviolettes UVB et UVA dans la cancérogenèse cutanée, auquel s'ajoutent les prédispositions génétiques des sujets (Bertrand, 2007).

✓ **Agents chimiques**

La plupart des agents chimiques cancérogènes agissent en se fixant à l'ADN pour former un adduit à ce dernier. Ces adduits peuvent conduire à des mutations (modification de patrimoine génétique) dont une conséquence peut être sa transformation en cellule cancéreuse. Certains agents chimiques agissent directement (génétoxique direct), d'autres les pro-génétoxiques, doivent subir une activation métabolique (Vincent *et al.*, 1998).

2.1.2. Infection virale

Les virus sont l'un des facteurs à haut risque et qui sont étroitement liés à des cancers humains. L'étiologie virale a été proposée dans plusieurs cancers humains, par exemple, EBV dans le carcinome indifférencié du nasopharynx et le lymphome de Burkitt, et de l'hépatite B et C dans le carcinome hépatocellulaire. On estime que l'oncogenèse virale est un facteur étiologique de 20% de tous les cancers chez l'homme (El Amrani *et al.*, 2013).

2.1.3. Perturbation hormonal

Les hormones stéroïdes ovariennes de par leur effet mitogène sont des agents promoteur des tumeurs hormonaux-sensibles. Elles augmentent l'incidence des mastopathies prolifères ainsi que la croissance des cellules cancéreuses mammaires en culture et des tumeurs mammaires *in vivo* chez les rongeurs. (Rochefort et Rouesse, 2008).

3. Les 3 étapes de l'oncogenèse

✓ **L'étape d'initiation**

Dans la phase d'initiation du cancer, les mutations génétiques et les altérations structurales induites par les dommages oxydatifs pourront être l'origine de l'activation d'oncogènes et de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Lors d'une absence de réparation ou lors d'une réparation dite fautive de l'ADN, les ERO peuvent avoir des effets mutagènes. En plus, les processus de peroxydation lipidique peuvent aussi contribuer dans le mécanisme de cancérogenèse en formant des adduits avec l'ADN (Guéritat, 2015).

Les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires en modifiant dans la cellule la régulation redox du glutathion (GSH) qui est un agent antioxydant important. Il en résulte une activation de la thiorédoxine (TRX) qui active le facteur de transcription qu'est le NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) (joue un rôle majeur dans plusieurs processus d'oncogenèse, incluant le développement et métastase). Une fois activé, le NF- κ B migre dans le noyau de la cellule où il peut transactiver des gènes cibles (Figure 1). Il participe de la sorte à la synthèse de nombreux médiateurs comme des protéines d'adhésion impliquées dans le processus du développement du cancer (Brian *et al*, 2009).

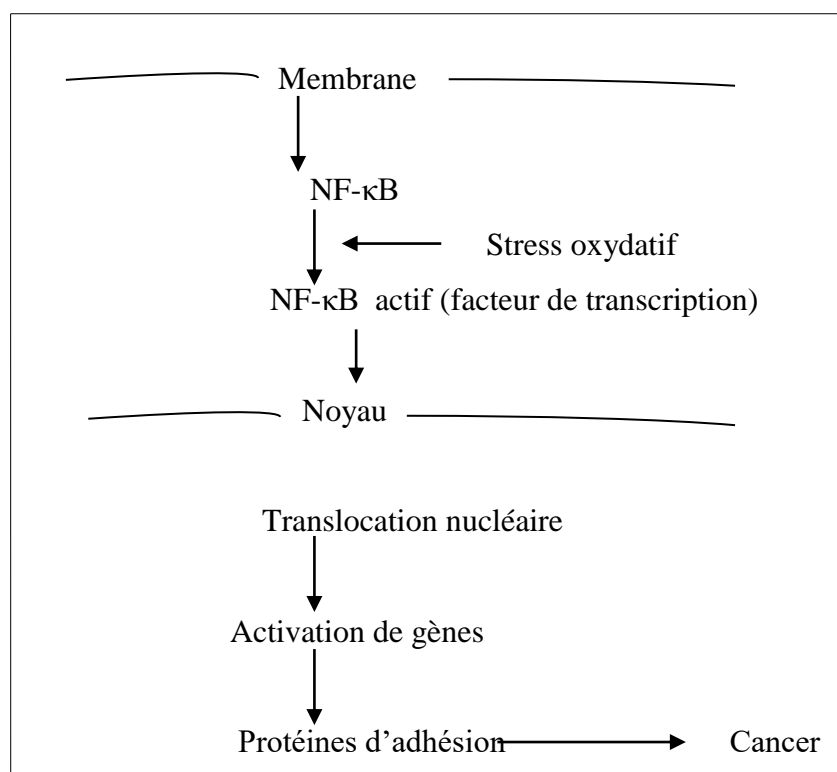


Figure 1 : Induction de la cancérogenèse via l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B induite par le stress oxydatif (Pincemail *et al.*, 1999).

✓ La promotion

Les ERO peuvent participer à la phase de promotion de la tumorigenèse en modulant les voies de signalisation impliquées dans l'augmentation de la prolifération cellulaire et/ou la diminution de la mort cellulaire. *In vitro*, les niveaux des ERO intracellulaires et extracellulaires sont statiquement plus élevés durant la croissance cellulaire notamment durant la phase S et

G2/M du cycle cellulaire. Il est suggéré que ces dernières, plus invasive et caractérisées par des niveaux plus élevés de 8-OHdg (Guéritat, 2015).

✓ **La dernière phase de propagation (progression)**

La progression tumorale implique des changements cellulaires et moléculaires irréversibles, caractérisés par une accumulation de désordres génétique supplémentaire, par une instabilité génétique et par une perturbation de l'intégrité chromosomique étroitement corrélés à l'augmentation du stress oxydant dans le tissu cancéreux au cours de l'évolution tumorale. Une fois formées, les tumeurs malignes constituées d'un nombre considérable de cellules peuvent envahir les tissus avoisinants ou essaimer vers d'autres organes et former des tumeurs secondaires appelées métastases (Pincemail *et al.*, 1999 ; Guéritat, 2015).

4. Méthodes conventionnelles de traitement contre tous les cancers

Le cancer a toujours été la principale cause de décès dans le monde depuis des décennies. Ainsi, les scientifiques se sont activement consacrés à l'étude thérapeutique du cancer (Thippeswamy *et al.*, 2011).

4.1. Chirurgie

C'est un traitement local du cancer qui a pour objectif d'enlever la tumeur et les ganglions, elle peut être conservatrice ou radicale. La chirurgie est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres traitements (Weinberger *et al.*, 2012).

4.2. Radiothérapie

Les premières utilisations des radiations ionisantes dans le traitement du cancer avancé, remontent à la fin du 19^{ème} siècle. La dose administrée et le type de rayonnement utilisé sont fonction de la tumeur, de son volume, de la tolérance des tissus sains avoisinant ainsi que de l'association ou non, à d'autres traitements comme la chirurgie et/ou la chimiothérapie. (Barthelemy *et al.*, 2012).

4.3. Immunothérapie

Notre système immunitaire lutte tous les jours contre les cellules cancéreuses. Pourtant, il arrive que certaines cellules cancéreuses passent à travers des mailles du filet. Ces cellules ont pour la plupart développé de nouvelles aptitudes leur permettant de se subtiliser à la surveillance du système immunitaire ou encore, de l'inhiber. Il semble donc pertinent de relancer le système

immunitaire contre la tumeur en le forçant à détecter ce qui lui était caché. C'est le principe de l'immunothérapie du cancer (Guillaume, 2009).

4.4. Chimiothérapie

La chimiothérapie comprend l'utilisation d'agents chimiques pour arrêter la croissance et à éliminer les cellules cancéreuses, même à des emplacements éloignés de l'origine de la tumeur primaire, les anthracyclines sont parmi les médicaments les plus efficaces actuellement disponibles pour le traitement des maladies néoplasiques. (Mauro *et al.*, 2017 ; Shivani *et al.*, 2014 ; Chang *et al.*, 2011). (Tableau 1).

Tableau 1 : Médicaments les plus utilisés pour la chimiothérapie (Tannock et Hill, 1998).

<u>Agent alkylants</u>	<u>Produits naturels et leurs dérivés</u>
Moutard azotée	<u>Anthracyclines</u>
Chlorambucil	Doxorubicine
Melphalan	Daunorubicine
Cyclophosphamide	Epirubicine
Nitroso-urée	Mitoxantrone
Ifosfamide Actinomycine D	Mitomycine C
Busulfan Bleomycine	
	<u>Alkaloides Vinea</u>
	Vinblastine
	Vincristine
	CCNU Vindesine
	Etoposide (VP-16)
	Camptothecins
<u>Antimétabolites</u>	<u>Taxanes</u>
Méthotrexate	Paclitaxel
5-Fluorouracil	Docetaxel
Cytosine Arabinoside	
6-Thiouanine	
6-Mercaptopurine	<u>Autres agents</u>
Gemcitabine	Cisplatine
Carboplatine	

II. Doxorubicine et toxicité

1. Historique

La famille de médicaments anthracyclines (ANTs) origine dans les années 1950 avec l'identification de la daunorubicine de la bactérie du sol *Streptomyces peucetius*. Dans les années 1960, la daunorubicine a été trouvée pour être très efficace dans le traitement des leucémies et des lymphomes. Aussi dans les années 1960, un dérivé de la daunorubicine, 14-hydroxydaunomycine ou Adriamycine (doxorubicine plus tard pour être renommé), a été identifié et avéré être un agent antitumoral plus efficace (Akman *et al.*, 2015).

Suite à son isolement à partir de *Streptomyces peucetius*, la daunorubicine (DAU, aussi connu comme la daunomycine ou rubidomycine) a été le premier antibiotique anthracycline (ANT) impressionnant avec une activité clinique dans le traitement des leucémies aiguës pédiatriques. (Sterba *et al.*, 2013).

Depuis l'introduction de la doxorubicine (DOX) pour le traitement du cancer en 1969, ce composé a démontré une grande efficacité antitumorale. La DOX a un effet cytotoxique sur les cellules malignes, ainsi que ses effets toxiques sur les divers organes sont considérés comme étant liés à son activité de liaison d'intercalation de l'ADN et de lipides de la membrane cellulaire (Nirwane *et al.*, 2014 ; Mingning *et al.*, 2017).

2. La doxorubicine

La doxorubicine est un large spectre agent chimiothérapeutique puissant, défini comme l'un des agents les plus utiles comme un antibiotique antitumoral et anticancéreux, qui est très efficace dans le traitement des patients atteints de cancer tel que : la leucémie lymphoblastique aiguë, le lymphome de Hodgkin, lymphomes non hodgkiniens agressif, le carcinome du sein, carcinome de l'ovaire et de nombreuses tumeurs solides (Hanušová *et al.*, 2013 ; Alishahi *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014 ; Ahmed *et al.*, 2017). Malheureusement, n'est pas suffisamment efficace dans de nombreux cas, mais l'augmentation de la posologie de la DOX est limitée en raison de sa toxicité systémique, en particulier la cardiotoxicité (Hanušová *et al.*, 2013 ; Alishahi *et al.*, 2013).

3. Pharmacologie

3.1. Structure moléculaire

La structure chimique des ANTs est complexe (Montaigne *et al.*, 2012), comme le montre la (Figure 2), la DOX est composée d'aglycone et des fragments sucres. L'aglycone, appelé doxorubicinon, est composé d'un anneau tétracyclique avec des groupements quinoniques-hydroquinone adjacentes (Louisse *et al.*, 2017). Les groupements quinoniques ont une importance toxicologique en raison de leur implication tant dans la biotransformation réductrice et oxydative conduisant à des espèces hautement réactives impliqués dans la cardiotoxicité, et d'une chaîne latérale courte avec un groupe carbonyle en C-13 et d'un alcool primaire en C-14 ; le sucre, appelé daunosamine, est fixé par une liaison glycosidique au C-7 du noyau tétracyclique, et se compose d'un groupement 3-amino-2,3, 6-tridéoxy-L-fucosyl (Sacco *et al.*, 2003 ; Montaigne *et al.*, 2012).

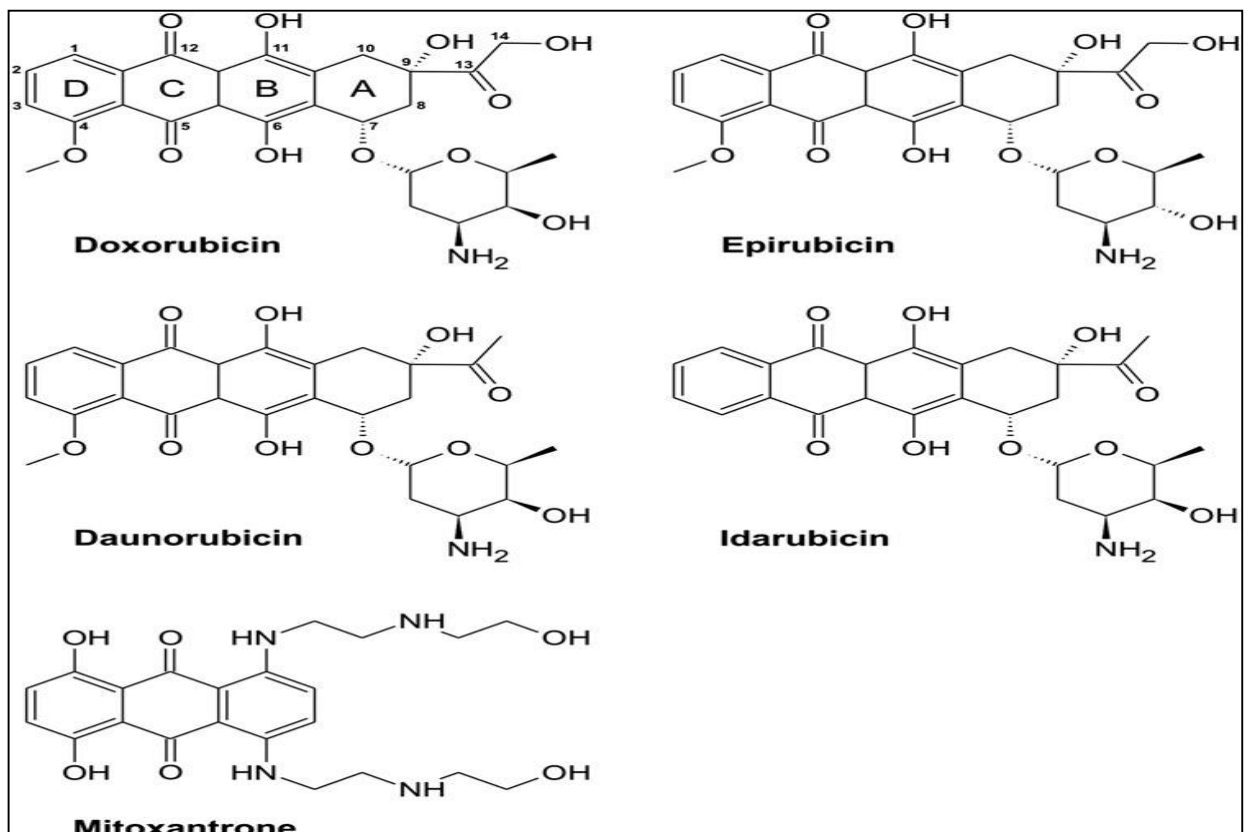


Figure 2 : Structure de la doxorubicine, épirubicine, donorubicin, idarubicin. (Sacco *et al.*, 2003).

3.2. Pharmacocinétique

Les agents anticancéreux ont une fenêtre thérapeutique très étroite, et leurs caractéristiques pharmacologiques et pharmacocinétiques doivent être particulièrement prises en compte afin d'optimiser l'efficacité des traitements tout en minimisant leur toxicité. Il est généralement admis que l'activité d'un agent anticancéreux dépend de sa concentration et de la durée pendant laquelle il est au contact de la tumeur. Or, le plus souvent, la dose efficace est très proche de la dose toxique, et c'est donc le schéma d'administration. L'hydrophobicité de la doxorubicine associée à sa nature de base faible non chargée lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique par un mouvement de flip-flop du feuillet externe au feuillet interne (Figure 3) (Borst *et al.*, 2000).

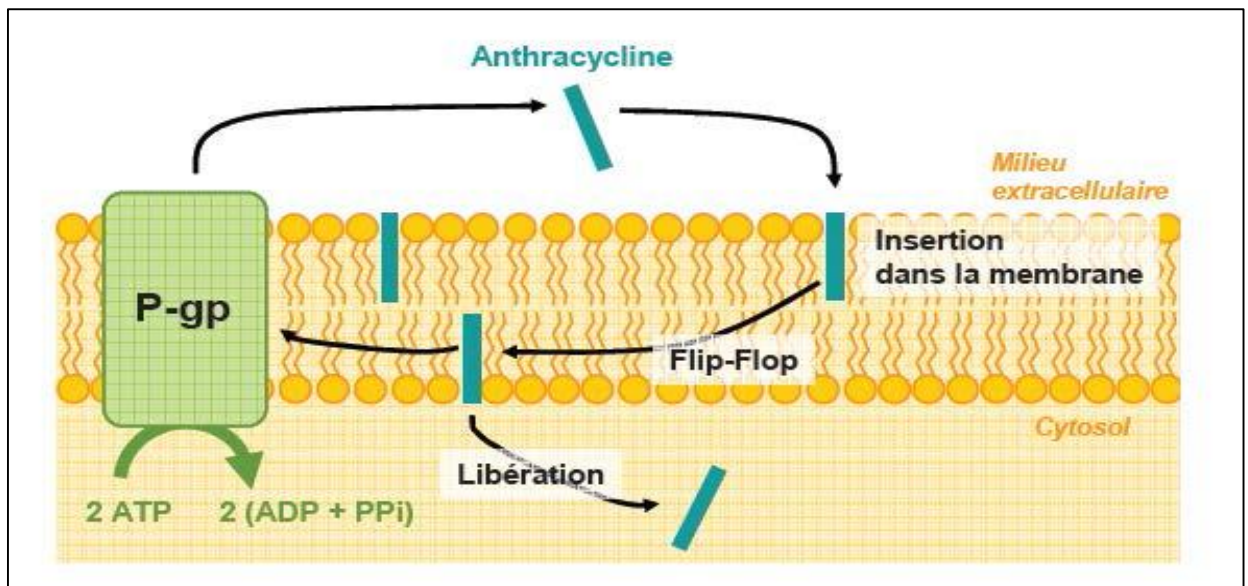


Figure 3 : Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop (changement de position des molécules d'un feuillet de la bicouche à l'autre) (Borst *et al.*, 2000).

✓ Absorption et distribution

Une fois absorbés, les médicaments passent dans la circulation systémique, à partir de laquelle ils sont distribués dans l'ensemble des tissus et organes de l'organisme (Ahmane *et al.*, 2014).

✓ **Métabolisme**

Le métabolisme de la DOX se déroule principalement au niveau du foie, c'est un processus très complexe comprend plusieurs interactions :

- Réduction de la Fonction carbonyle (C = O) de l'atome de carbone numéro 13 dans la chaîne latérale de la DOX a un groupement alcoolique (OH) et cela par stimulation de l'enzyme cytoplasmique (NADPH-dépendent Aldo-céto réductase) et formation du métabolite hydroxy doxorubicine (Figure 4), nommé doxorubicinol qui est le principal métabolite actif de ce médicament (Manach *et al.*, 1996).
- Déglycosylation en activant l'enzyme cytochrome P₄₅₀ réductase et formation de hydroxy aglycones ou déoxy aglycones.
- Ensuite la DOX et ses métabolites sont excrétés par la bile sous forme de DOX ou doxorubicinol ou bien sous forme de sulfates et glucuronides après 48Heures.

La réduction enzymatique et le clivage en sucre de daunosamine aglycone sont accompagnés par la formation des radicaux libres.

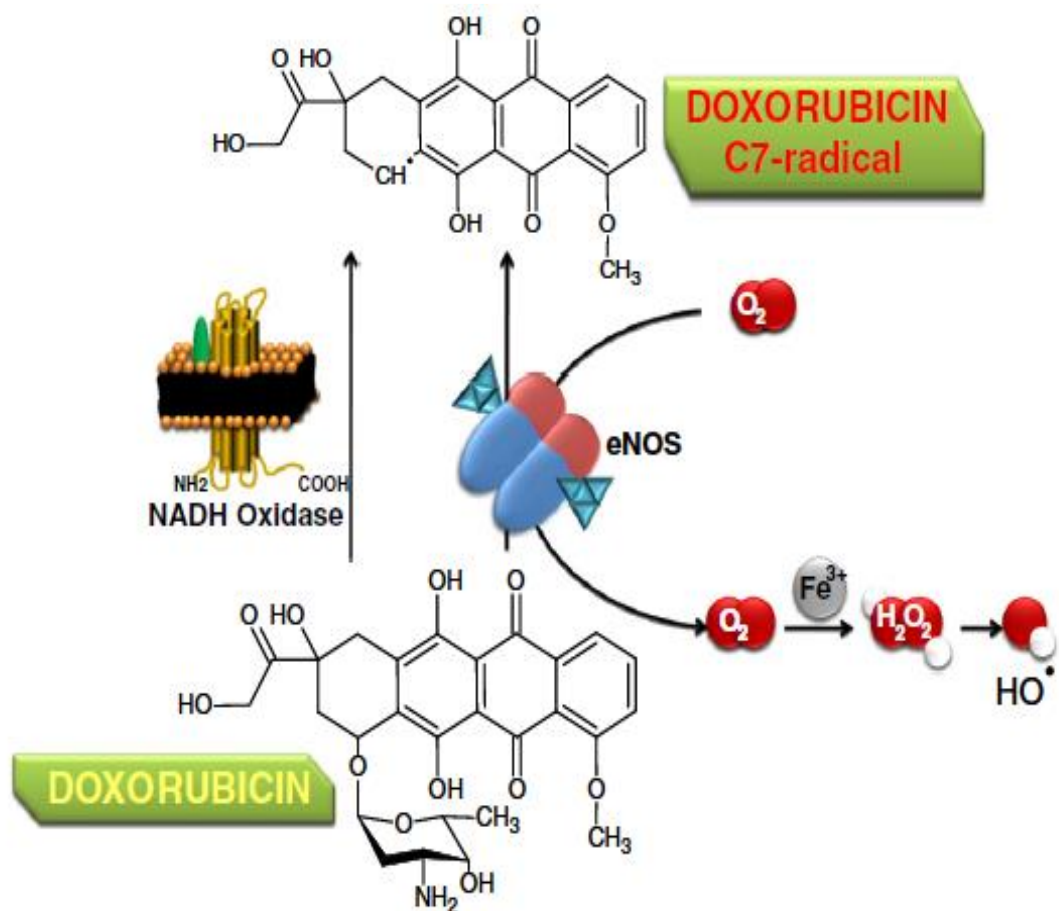


Figure 4 : Métabolisme hépatique de la doxorubicine (Octavia *et al.*, 2012).

✓ **Excrétion**

L'élimination de la DOX est biliaire, lente à partir des tissus qui se traduisent par une demi-vie terminale de 20 à 48 heures (Xiuzhen *et al.*, 2007), alors que seulement 5 à 12% du médicament et de ses métabolites apparaît au cours de la même période de temps dans l'urine (Manach *et al.*, 1996).

4. Principaux mécanismes d'action

✓ *Intercalation dans la molécule d'ADN*

La DOX s'insère entre deux paires de bases azotées, modifiant ainsi la structure de l'ADN (Tsao, 2010). Ce changement conduit à entraver la corrélation enzymatique, les enzymes de réplication de l'ADN polymérase, des enzymes de clonage ARN polymérase, les enzymes de réparation de l'ADN ..., et inhibe ainsi les processus de réplication (Kocahan *et al.*, 2017).

✓ *Interaction avec l'enzyme topo-isomérase II*

La topo-isomérase II, qui est une enzyme nucléaire chargée de modifier l'ADN lors de la transcription, la réplication et la mitose, elle permet notamment d'ajouter et d'enlever des supers tours dans les molécules d'ADN (Garazd *et al.*, 2003 ; Dornfeld *et al.*, 2015). La DOX se relie avec le topo-isomérase II par des liaisons covalentes stables (irréversibles) formant ainsi le complexe topo-isomérase II -ADN-DOXO qui inhibe l'enzyme topo-isomérase II ce qui entraîne des ruptures de brins d'ADN et induit l'apoptose (Figure 5) (Tsao *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Louisse *et al.*, 2017).

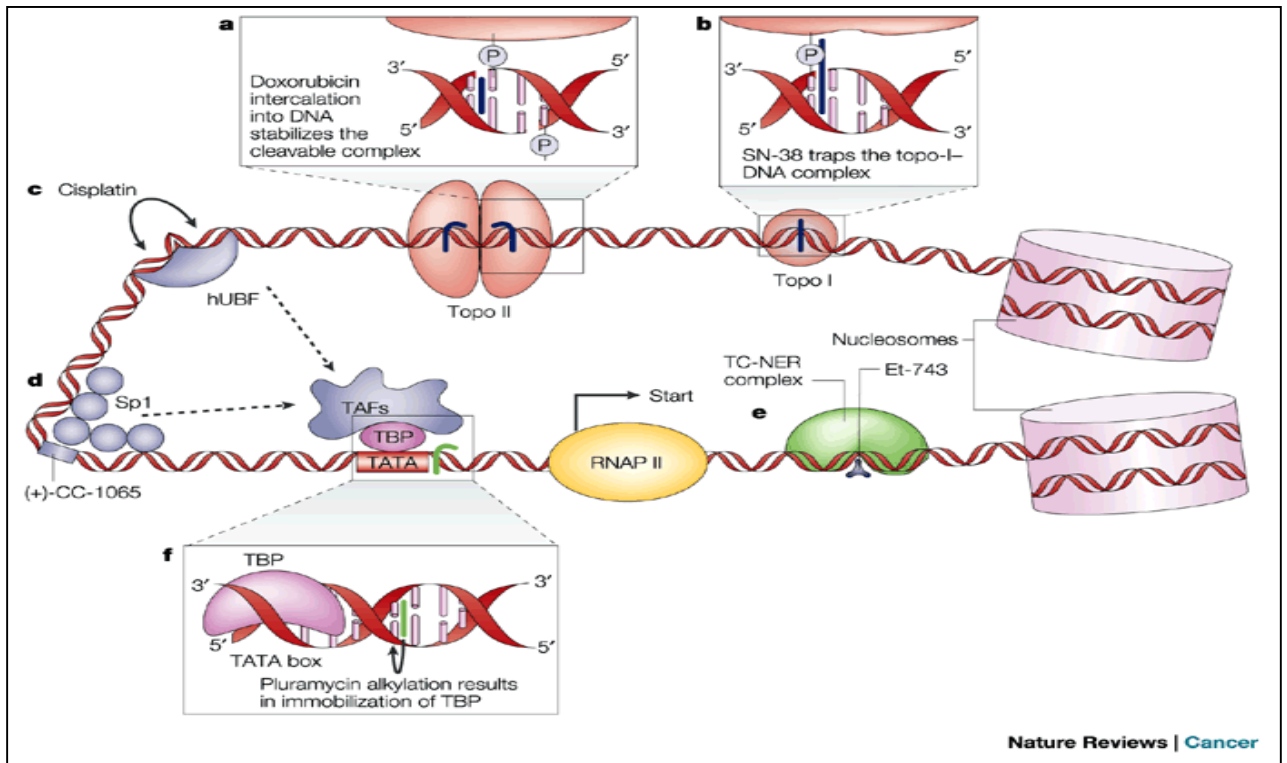


Figure 5 : Interaction dans l'ADN et stabilisation de l'enzyme topoisomerase II (Bohm *et al.*, 1998).

✓ *Formation des radicaux libres*

Les composés de dégradation de la doxorubicine entraîneraient la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}). Ces radicaux libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (Crozier, 2009).

5. Toxicité de doxorubicine

Bien que le mécanisme sous-jacent de la cytotoxicité sévère de DOX soit pas entièrement claire, les ROS sont supposés être un facteur clé dans la toxicité de DOX et les événements qui contrôlent cette blessure oxydative sont largement appréciés. Cependant, le mécanisme de toxicité organique n'est pas clair (Kawaii *et al.*, 1999). En dépit de son efficacité antitumorale élevée, l'utilisation de DOX en chimiothérapie a été largement limitée en grande partie en raison de la diversité de ses effets secondaires indésirables graves toxiques dépendants de dose sur divers organes tels que : le cœur, les reins, les poumons, et les testicules (Injac *et al.*, 2008 ; Chira *et al.*, 2008 ; Tsao, 2010). Une hépatotoxicité et toxicité hématologiques sont aussi illustrés (Day *et al.*, 2000 ; Tsao, 2010).

II.1. Doxorubicine et stress oxydant

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la toxicité de la DOX (Injac *et al.*, 2008). Le dommage oxydatif est médié par la génération des ROS, à savoir, l'induction de la formation des radicaux hydroxyles, est probablement le mécanisme de l'activité antitumorale du DOX (Grayer et Veitch, 2006).

1. Le stress oxydant

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant ». En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante, ou encore par une association de ces deux phénomènes. Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Pincemail *et al.*, 2007).

2. Les espèces réactives de l'oxygène et leur origine

Le système prooxydant comprend les espèces réactives de l'oxygène (ERO) soit de source exogène, soit de source endogène et peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P₄₅₀ au cours de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'ERO (Barouki, 2006).

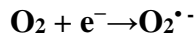
2.1. Les radicaux libres oxygénés

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux, ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui donnait leur naissance. L'ensemble des

radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène** (Favier, 2003 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003).

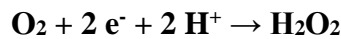
- L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Le radical superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles), et il participe à l'inactivation des virus et bactéries.

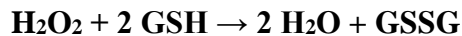


-Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés). Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène en présence d'oxydases comme les peroxysomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H_2O_2 .



Sa concentration est régulée par des enzymes telles que les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol).



- Le radical hydroxyle HO^{\cdot}

Il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de Fenton à partir de H_2O_2 . L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le radical hydroxyle formé est très oxydant. Il peut initier une peroxydation lipidique qui pour continuer en chaîne. C'est le radical le plus dangereux pour l'organisme.

-Les radicaux peroxydes (ROO^{\cdot})

L'attaque des molécules biologiques (R-H), principalement les lipides, l'ADN et les protéines, par le radical (HO^{\cdot}) génère des radicaux organiques, qui peuvent réagir avec l'oxygène pour former le radical ROO^{\cdot} . Celui-ci peut exister sous forme protonée (hydroperoxyde $ROOH$) très réactive.

1.2. Origine des espèces réactives de l'oxygène

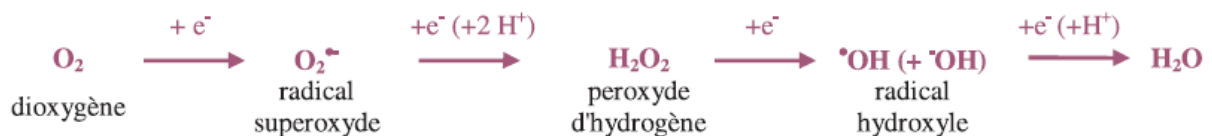
Les différentes sources des radicaux libres sont mentionnées dans le (Tableau 2) :

Tableau 2 : Principaux systèmes de production des ERO (Pincemail *et al.*, 2001).

Dans l'organisme	Extérieurs à l'organisme
<ul style="list-style-type: none"> ✓ altération du transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (ischémie -reperfusion) ✓ biosynthèse des prostaglandines ✓ oxydation de l'hémoglobine ✓ oxydation du glucose ✓ libération du fer de ses protéines de transport ✓ agrégation des plaquettes ✓ activation des cellules endothéliales ✓ activation des globules blancs ✓ cytochrome P 450 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ exposition au soleil (UV) ✓ exposition aux irradiations (rayon γ) ✓ amiante ✓ pollution ✓ ozone ✓ alimentation ✓ fumée de cigarette ✓ médicaments ✓ ...

✓ L'origine endogène des ROS

L'origine des radicaux libre endogène issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être, produits lors de « déviations » du métabolisme cellulaire. En effet, La respiration oxydative est la principale source d'énergie pour les cellules aérobies. L'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)). La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et HO^{\cdot} selon la réaction suivante :



Le processus n'est toutefois pas parfait car une faible partie de l'oxygène (2 à 5%) est convertie en ERO particulièrement réactives, mais elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie) (Pincemail *et al.*, 2001 ; Favier, 2003 ; Pincemail *et al.*, 2003).

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme face à une agression extérieure. Plusieurs agents peuvent en être responsables. Ce processus, divisé en une phase vasculaire et une phase cellulaire, est donc indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Les cyclooxygénases 1 et 2 sont les enzymes clés, qui orchestrent et induisent ce processus. Leur action, lors de la phase vasculaire de l'inflammation, convertit l'acide arachidonique en prostaglandines et thromboxanes (Zhang *et al.*, 1999).

✓ L'origine exogène des ROS

L'environnement externe est également une source des ROS. Il y a, par exemple, les UVA et UVB qui sont connus pour interagir avec des molécules endogènes à la peau et générer de l'oxygène singulet ou des intermédiaires actifs (Rees *et al.*, 2004).

Les mono-oxygénase du système cytochrome P 450 (CYP 450), impliqué dans l'élimination des xénobiotiques, sont également une source importante. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments (Favier, 2003 ; Rees *et al.*, 2004).

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres (Barouki, 2006).

Plusieurs médicaments anticancéreux produisent des ROS qui peuvent être responsables de la toxicité et des effets secondaires néfastes. L'administration de la doxorubicine conduit à la formation de métabolites réactifs par exemple : l'O₂⁻ et l'H₂O₂, ces dernières attaquent les membranes cellulaires, ce qui conduit à la peroxydation des acides gras polyinsaturés, la libération de MDA, et l'épuisement du glutathion (Boutabet *et al.*, 2011).

3. Les espèces réactives de l'oxygène et ses effets cellulaires ; implication en pathologie

3.1. Dommages de l'ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO qui peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2' deoxyguanosine (8-OHdG) (Figure 6) qui se couple normalement avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations guanosine-thymine dans le brin fille de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer (Pencemail *et al.*, 1999 ; Pencemail *et al.*, 2001 ; Haleng *et al.*, 2007).

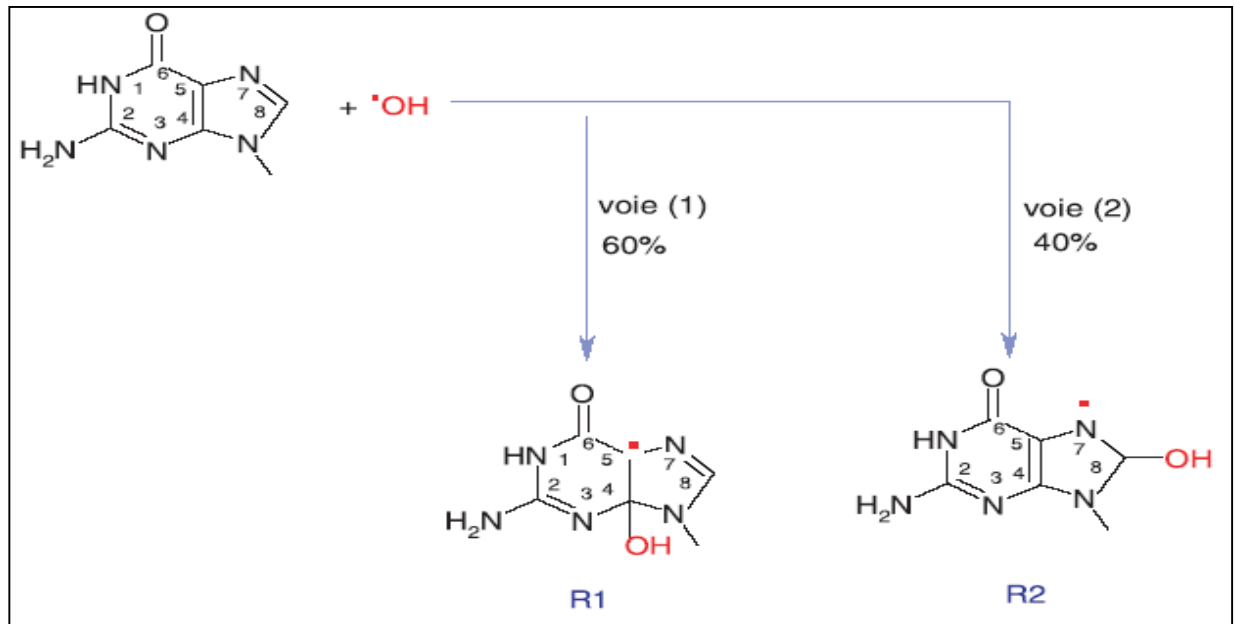


Figure 6 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine. Deux radicaux libres sont formés : R1 (centré sur l'atome de carbone 5) et R2 (centré sur l'atome d'azote 7). Ce dernier (R2) donne naissance à la 8-oxoguanine un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

3.2. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène, c'est pour cette raison tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine sont concernés. *In vivo*, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes et de récepteurs...) (Nakagawa, 2004).

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme les acides linoléiques ou arachidonique sont les cibles privilégiées des ERO. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH). Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits que sont les aldéhydes et les hydrocarbures. Par ailleurs, la Malondialdéhyde (MDA), utilisée comme marqueur de la peroxydation lipidique reflète le statut oxydatif des individus exposés aux xénobiotiques. La détection spectrophotométrique d'MDA par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) est la

méthode la plus ancienne et la plus populaire pour mesurer la peroxydation lipidique (Pencemail *et al.*, 1999).

La phase d'initiation, sous l'action d'une déshydrogénation, engendre la production d'un radical libre. Ce composé est le produit de la rupture d'une liaison carbone hydrogène du groupement méthylène d'un acide gras, sous l'influence d'un composé radicalaire réactif.

La propagation, en présence d'O₂, se traduit par une succession de réactions rapides et lentes qui engendrent la production de plusieurs radicaux libres. La terminaison est la troisième et la dernière phase du processus. Elle correspond à une dimerisation des radicaux libres (Figure 7). En d'autres termes, les radicaux libres formés lors de l'étape de propagation réagissent entre eux pour former des composés non radicalaires (Savina, 2014).

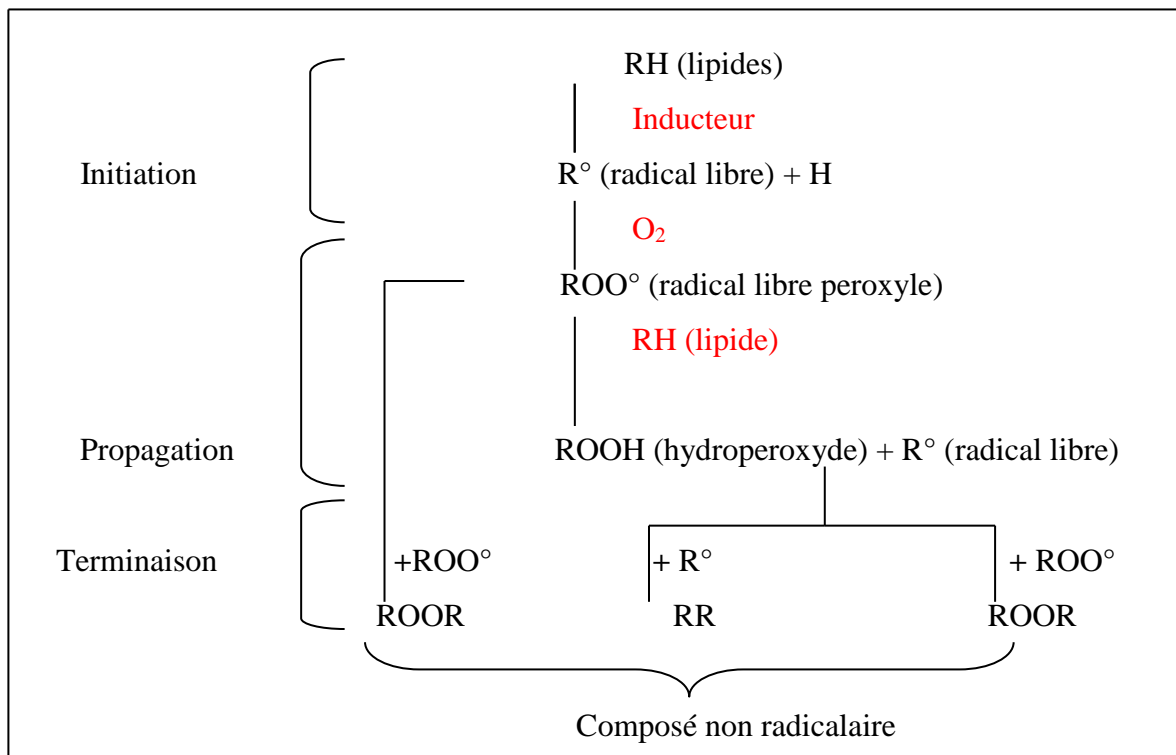


Figure 7 : Schématisation des différentes phases du processus de peroxydation des lipides (Sodergren, 2000).

3.3. Oxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés, qui possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la

cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Pencemail *et al.*, 1999) (Figure 8).

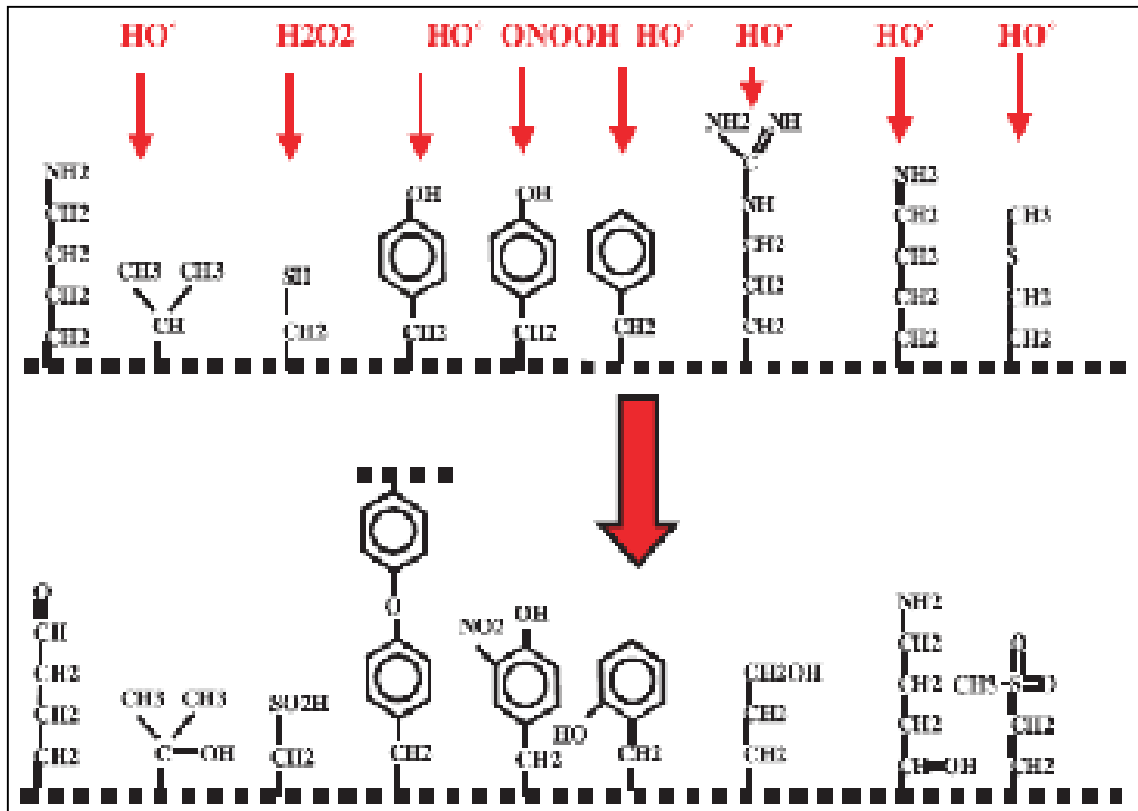


Figure 8 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire. Les ERO peuvent interagir avec des protéines, de l'ADN, des lipoprotéines et des acides gras polyinsaturés pour former des dérivés oxydés. L'organisme peut aussi réagir contre ces dérivés anormaux par production des antioxydants qui peut agir directement ou indirectement en tant que moyen de défense contre les dérivés actifs de l'oxygène et s'opposent aux mécanismes d'oxydation de certaines molécules (Haleng *et al.*, 2007) (Figure 9).

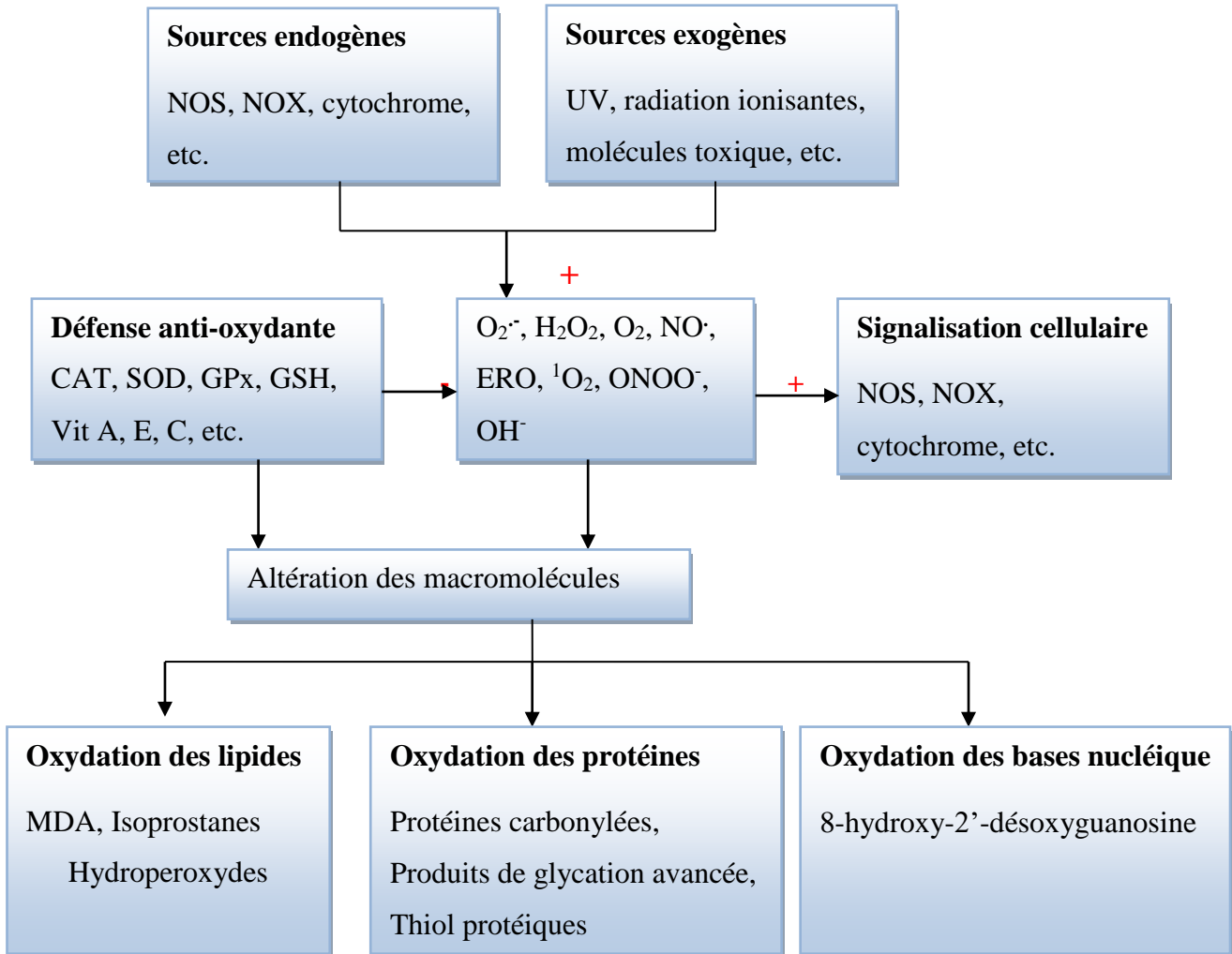


Figure 9 : L'homéostasie oxydative cellulaire. Interrelation entre le statut oxydant et le stress oxydant. NOS : oxyde nitrique synthase ; UV : ultraviolet ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; CAT : Catalase ; GSH : glutathion ; VIT : vitamine ; MDA : Malondialdéhyde (Rossary et Steghen, 2013).

4. Les antioxydants

L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action de molécules dites antioxydantes. Celles-ci ont pour rôle d'empêcher les ERO d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique (Pencemil *et al.*, 2001).

4.1. Les systèmes endogènes enzymatiques

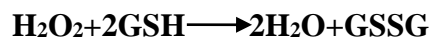
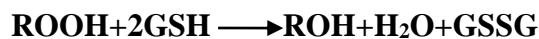
✓ Le superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui catalyse l'élimination des radicaux libres oxygène et diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par réduction univalente de

l'oxygène. Il en existe de trois types : une SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu-Zn-SOD), localisée dans le cytosol des cellules eucaryotes et dans les globules rouges ; une SOD contenant du manganèse (Mn), située dans les mitochondries, et un facteur de haut poids moléculaire à activité SOD situé dans le plasma et les poumons humains (Michel, 1983 ; Pencemail *et al.*, 1998 ; Defraigne et Pencemail, 2007).

✓ **Les glutathion peroxydases (GPxs)**

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques (réaction 1) résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés et non lipidique (réaction 2), en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme réducteur. La réaction transforme le glutathion en glutathion oxydé (GSSG), dans lequel deux molécules sont unies par un pont disulfure (Rees *et al.*, 2004 ; Haleng *et al.*, 2007).



✓ **Catalase (CAT)**

La catalase (CAT), cette enzyme tétramérique, contient des groupes hémiques ferriques, responsable de l'activité catalytique. Elle est principalement présente dans les peroxysomes de diverses cellules, dans les plaquettes et le stroma des érythrocytes. Le substrat de cette enzyme est le H₂O₂ (Pencemail *et al.*, 1998 ; Rees *et al.*, 2004). Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Goudable et Favier, 1997). La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



✓ **Le système thiorédoxine**

L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des

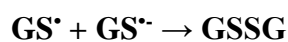
peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Haleng *et al.*, 2007).

4.2. Les systèmes endogènes non enzymatiques

✓ Le glutathion(GSH)

Le glutathion (GSH) joue un rôle unique et essentiel dans la préservation des formes actives de divers antioxydants de faible taille (vitamines C, E, ubiquinone, polyphénols). A ce titre, le GSH constitue l'antioxydant principal de l'organisme d'autant qu'il est aussi le Co-facteur de toute une série d'enzymes antioxydantes (glutathion peroxydases, glutathion réductase, thiorédoxine et peroxyrédoxines) (Defraigne et Pincemail, 2007).

Ainsi, par exemple, le glutathion (GSH) réagira avec le radical HO[•] pour former du glutathion oxydé (GSSG) via la formation d'un radical thyl (GS[•]) intermédiaire selon le mécanisme suivant (Pencemail *et al.*, 1998) :



✓ La coenzyme Q-10

Est une molécule liposoluble présente dans toutes les cellules de l'organisme et servant de coenzyme à au moins trois enzymes mitochondriales essentielles pour la production d'ATP. Le Co Q10 est le transporteur d'électrons entre, d'une part, le complexe I et II, et d'autre part, le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (phosphorylation oxydative). C'est également par ce mécanisme qu'il exerce son deuxième grand rôle, c'est-à-dire sa fonction antioxydante, protégeant à la fois les protéines de la membrane mitochondriale et l'ADN cellulaire (Malchair *et al.*, 2005).

4.3. Les systèmes exogènes antioxydants

✓ La vitamine E

La vitamine E est un terme qui désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols ou tocols et il existe au moins sept types différents appelés constituants de la vitamine E (Pincemail *et al.*, 1998). C'est l' α -tocophérol qui est biologiquement le plus efficace (Figure 10).

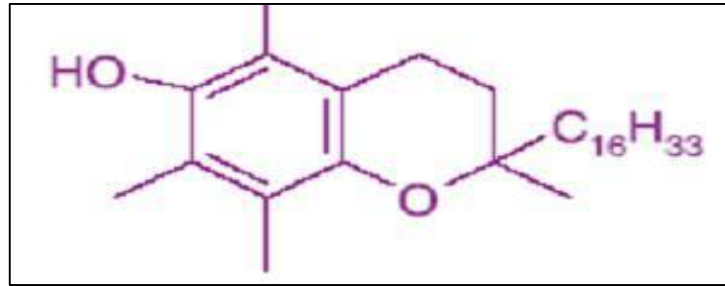


Figure 10 : La structure chimique de la vitamine E (α -tocopherol) (Gardèse-Albert *et al.*, 2003).

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique riche en acides gras polyinsaturés (RH) où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces oxygénées activées. (Pincemail *et al.*, 1998 ; Gardes-Albert et jore, 1998). Au cours de ces réactions, la vitamine E (TOH) passe par un stade radicalaire en devenant le radical tocophéryle (TO^{\bullet}). Ce dernier est pris en charge par d'autres antioxydants, dont plus particulièrement la vitamine C, qui le régénèrent en vitamine E (Figure 11) (Pincemail *et al.*, 1998).

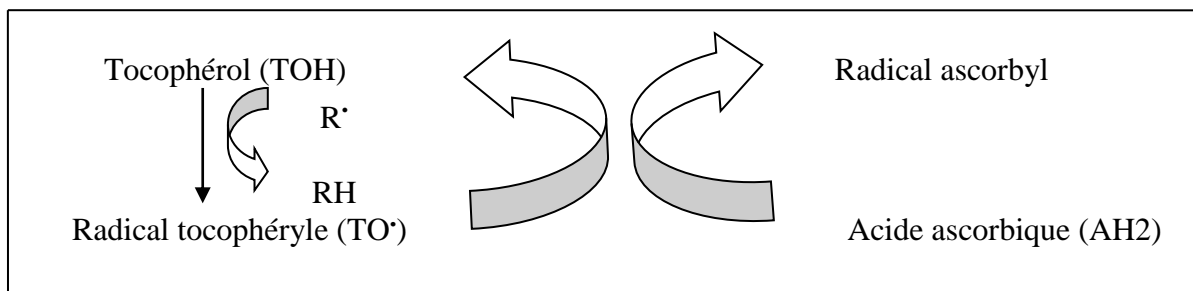


Figure 11 : Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique (Pincemail *et al.*, 1998).

✓ La vitamine C

L'acide ascorbique (Figure 12) agit comme antioxydant en donnant de l'hydrogène (agent réducteur). La présence de la fonction ènediol dans sa structure lui confère son activité de donner d'hydrogène nécessaire aux nombreuses réactions dans lesquelles est impliquée (Mangels, 1993), phénomène qu'on appelle aussi désoxygénation.

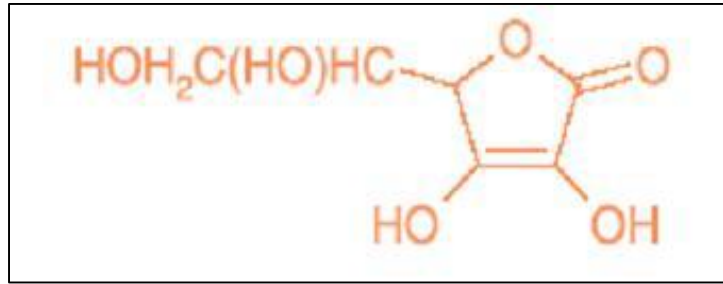


Figure 12 : La structure chimique de la vitamine C (acide ascorbique) (Gardèse-Albert *et al.*, 2003).

✓ Les caroténoïdes

Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A, car après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A. Tous les caroténoïdes ne possèdent toutefois pas cette propriété particulière (Haleng *et al.*, 2007).

5. Les anthracyclines et stress oxydant

Les anthracyclines (ANTs) sont bien connus pour leur capacité à produire les ROS par de multiples voies (Figure 13). Tout d'abord, une réduction d'électrons de l'anneau C du tétracycle des ANTs conduit à la formation d'un radical libre semiquinone. Son électron non apparié peut être donné à un oxygène formant radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). La dismutation de l'($O_2^{\cdot-}$) au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) ou peut se produire spontanément. Cependant, l'(H_2O_2) et l'($O_2^{\cdot-}$) peuvent générer des radicaux hydroxyles hautement réactifs et toxiques (OH^{\cdot}). Ceci a lieu pendant la réaction de Haber-Weiss, qui est très lente à moins catalysée par des métaux de transition, surtout le fer. Les premières cibles de dommages des radicaux libres à médiation des ANTs sont différentes : membranes cellulaires, qui sont riches en lipides sujettes à la peroxydation (Montaigne *et al.*, 2012 ; Sterba *et al.*, 2013).

Le deuxième mécanisme de base, en présence d'un système réducteur (NADH cytochrome P450 réductase ou des thiols, tels que la cystéine ou le glutathion), la quinone contenant dans la DOX est enzymatiquement activée par réduction à un électron, par la NADPH-cytochrome réductase du cytochrome P450 ou NADH-déshydrogénase, pour libérer un radical libre semiquinone qui conduit ensuite à la génération des ROS en présence d'oxygène moléculaire tel que l'anions superoxyde et des radicaux hydroxyles provoquant une peroxydation lipidique membranaire (LPO) (Grayer et Veitch, 2006 ; Nnenna *et al.*, 2011; Sterba *et al.*, 2013 ; Dornfeld *et al.*, 2015). L'ANT agit également comme un puissant chélateur de fer et le complexe résultant ANT- Fe^{2+} est un catalyseur efficace d' H_2O_2 et le converti à un radical hydroxyle (OH^{\cdot}) (Grayer et Veitch, 2006 ; Sterba *et al.*, 2013). En l'absence de systèmes de réduction, le complexe ANT-

Première partie : Synthèse bibliographique

Fe^{3+} peut réduire son fer chélaté par une réaction d'oxydoréduction intramoléculaire, par oxydation soit de la chaîne latérale sur le C-9 ou la fraction de l'hydroquinone à l'anneau B, formant un radical libre ANT-Fe^{2+} . En présence d' O_2 , ce complexe est oxydé ; cédant en ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et $\text{ANT-Fe}^{2+\cdot-}$ (Sterba *et al.*, 2013).

Les flavoprotéines appropriés catalysent la formation des radicaux semi-quinone réduits en acceptant des électrons de NADH ou de NADPH et de les passer à ANT dans une séquence de réactions connues comme le cycle d'oxydoréduction (Sterba *et al.*, 2013).

En outre, en dehors de la formation des ROS, l'exposition aux ANTs peut être aussi liée à la déréglementation de l'oxyde nitrique (NO). La production des radicaux libres et/ou la libération de NO induite par la DOX est entièrement responsable de la toxicité induite par DOX (Chira *et al.*, 2008) (Grayer et Veitch, 2006).

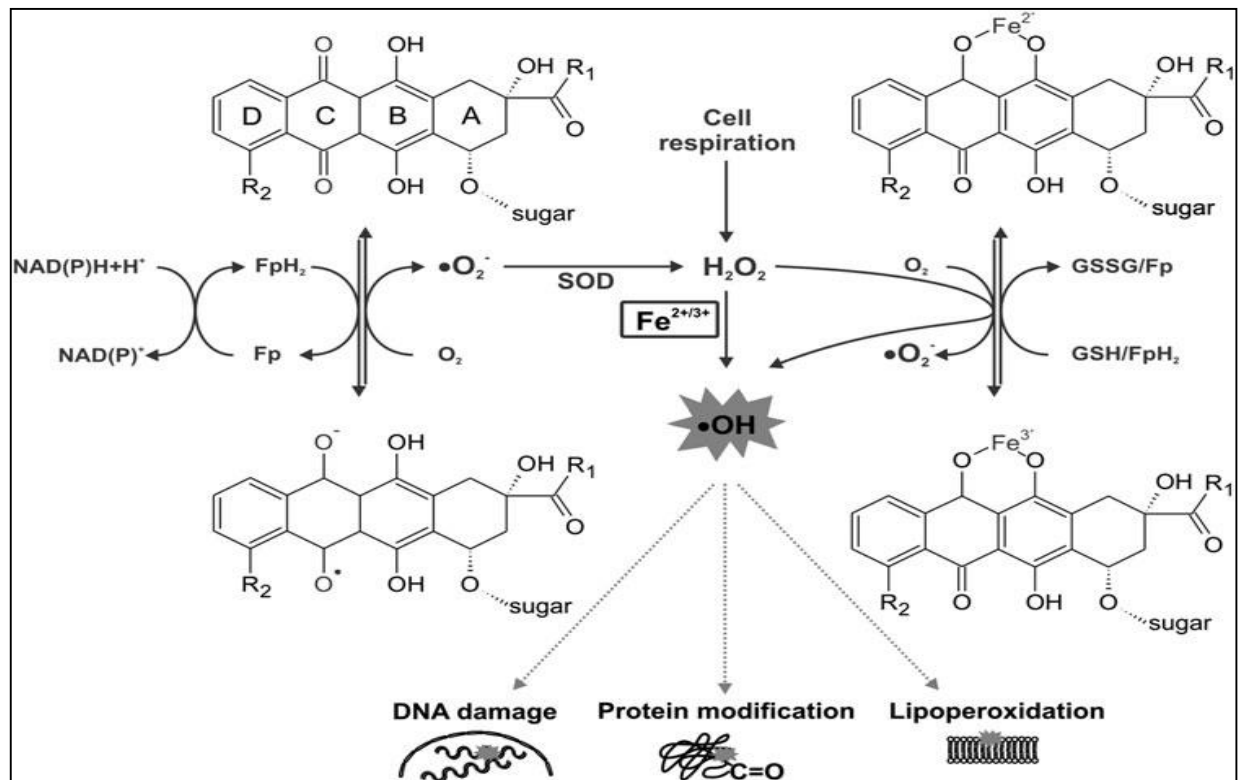


Figure 13 : Illustration schématique des voies principales d'induction des anthracyclines et la production de stress oxydatif par la catalyse du fer. Fe, le fer ; Fp, flavoprotéine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; H_2O_2 , le peroxyde d'hydrogène ; NAD (P), le nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate); ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Radical superoxyde ; $\cdot\text{OH}$, Radical hydroxyle ; SOD, superoxyde dismutase (Sterba *et al.*, 2013).

III. Effets secondaires majeurs de traitement à la doxorubicine

1. Toxicité cardiaque

La cardiotoxicité induite par la chimiothérapie peut être caractérisée comme étant de type 1 ou de type 2 basées sur l'effet de l'agent sur des cardiomyocytes. La cardiotoxicité du type I est causées par la mort des cardiomyocytes, soit par nécrose ou apoptose se manifeste par une insuffisance cardiaque chronique, et par conséquent n'est pas réversibles aussi bien chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. Paradoxalement la cardiotoxicité de type II est causée par un dysfonctionnement des cardiomyocytes plutôt que la mort des cellules et par conséquent peut être réversible (Volkova et Russell, 2011).

Une action antitumorale de la DOX est médiée par un grand nombre de mécanismes, mais l'une des activités, à savoir d'un stress oxydatif et la génération des radicaux libres, est une des principales causes de cardiotoxicité (Hanušová *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014). Ce fait permet aux chercheurs de développer des stratégies pour réduire les effets toxiques de la DOX sans interférer avec ses propriétés antitumorales (Khan *et al.*, 2014).

1.1. Principaux mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines

Le mécanisme de cardiotoxicité induite par les anthracyclines est controversé et n'est pas parfaitement connu, c'est pour cette raison plusieurs hypothèses ont été proposées (Fetohi *et al.*, 2012 ; Ichikawa *et al.*, 2014). Les données les plus convaincantes supposent la génération des radicaux libres, mais aussi un mécanisme non enzymatique induisant la synthèse d'ions ferrique, qui auraient un potentiel délétère au niveau du myocyte du fait de sa faible capacité anti-oxydative (Fetohi *et al.*, 2012).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la cardiomyopathie induite par la DOX, tels que l'augmentation de stress oxydatif cardiaque et la peroxydation des lipides insaturés dans les membranes qui sont à l'heure actuelle considéré comme étant le facteur le plus important responsable du développement de la cardiotoxicité induite par la DOX, des changements dans l'activité de l'adénylate cyclase qui conduisent à l'apoptose et l'inflammation lié à une voie de signalisation (Mahmoud *et al.*, 2000 ; Basavaraj *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2015). Auparavant, l'hypothèse la plus largement acceptée pour la cardiomyopathie induite par l'ANT est la génération des ROS par l'échange d'électrons entre le fragment anthracycline de quinone et les molécules d'oxygène et d'autres donneurs d'électrons cellulaires. Les ANTs forment également

Première partie : Synthèse bibliographique

des complexes avec le fer qui subissent un cycle redox et génèrent des radicaux d'oxygène (Vejpongsa *et al.*, 2014).

Les mécanismes de cardiotoxicité des anthracyclines devraient donc être conciliés avec le concept d'une durée de vie à risque de cardiotoxicité. Une fois à l'intérieur de cardiomyocytes, une grande partie de la toxicité des ANTs semble dépendre d'événements de bioactivation (Spagnuolo *et al.*, 2011): le fragment quinone subit un cycle redox à médiation de NAD (P) H oxydoréductases à des organites intracellulaires, en générant des radicaux libres par une voie enzymatique par la chaîne respiratoire mitochondriale et par une voie non enzymatique impliquant des interactions directes entre les ANTs et le fer (Ayla *et al.*, 2011 ; Hahn *et al.*, 2014).

Le complexe fer-DOX a été connu depuis 1980, lorsque les premières études ont démontré que la DOX a une forte affinité pour le fer, et que le complexe de fer peut provoquer la peroxydation des lipides à travers ses interactions avec les membranes chargées négativement. La réduction de la DOX en présence de fer libre met également en place un cycle de génération de radicaux libres (redox de recyclage) et le métabolite doxorubicinol est connu pour interagir avec des groupes thiol sur des protéines, ce qui aggrave les dégâts de la cellule (Octavia *et al.*, 2006) .Ce cycle d'oxydoréduction conduit à la formation de l'anion superoxyde, qui est converti en H₂O₂ spontanément par le superoxyde dismutase tout en libérant le fer de la ferritine (Ayla *et al.*, 2011 ; Ichikawa *et al.*, 2014).

Par la suite, l'H₂O₂ peut être converti en radicaux hydroxyles hautement toxiques en présence de métaux lourds tels que le fer, par la réaction de fenton (Ichikawa *et al.*, 2014). Ces processus éventuellement favorisent la formation de fer catalysée de radicaux hydroxyles ou espèces réactives similaires capables d'induire des dommages oxydatifs, ou les radicaux hydroxyles toxiques provenant des complexes fer-anthracycline agissent comme des messagers cytotoxiques, la concentration intracellulaire du fer semble donc être un facteur clé dans la cardiotoxicité de la doxorubicine (Sacco *et al.*, 2003 ; Spagnuolo *et al.*, 2011 ; Hahn *et al.*, 2014).

En outre, il a été montré que la DOX pourrait stimuler le transport transmembranaire de l'arginine à fournir accrue de substrat et activer la production de NO par la médiation de NOS qui joue également un rôle dans la génération d'espèces réactives de l'azote à médiation des ANTs et aggrave le stress nitrosatif (Ayla *et al.*, 2011 ; Hahn *et al.*, 2014).

Première partie : Synthèse bibliographique

L'oxyde nitrique (NO) est un vasodilatateur puissant et un médiateur important dans la contraction du myocarde, et il est représenté comme étant impliquée dans la pathogenèse des maladies cardiaques tel que l'insuffisance cardiaque, l'ischémie / lésion de perfusion, et une cardiomyopathie. Des essais récents ont démontré que le NO est impliqué dans la cardiotoxicité associé à la DOX. Il a été montré que la DOX augmenté la synthèse de NO dans le plasma et le tissu cardiaque (Bahadir *et al.*, 2013 ; Yagmurca *et al.*, 2015 ; Mingning *et al.*, 2017).

En comparaison à d'autres types de cellules, les cardiomyocytes sont très riches en mitochondries qui ont été définies comme l'une des cibles de dommage subcellulaire induite par la DOX dans le tissu, mais relativement pauvre en enzymes détoxifiants des ROS; il en résulte que les cardiomyocytes seraient facilement succomber à une production soutenue des ROS que la dégradation du sarcomère, un dysfonctionnement mitochondrial et lésions d'ADN, perturbation cardiaque spécifiques des programmes d'expression de gènes, ou la mort apoptotique nécrotique induite par la suite (Figure 14) (Ayla *et al.*, 2011 ; Marques-Aleixo *et al.*, 2017).

Le risque de la cardiotoxicité des anthracyclines pourrait être mieux concilié avec leur conversion en métabolites secondaire, formé après la réduction à deux électrons de leur groupe carbonyle de la chaîne latérale. Être plus polaire que leurs médicaments parents, les métabolites secondaires sont mal éliminés de cardiomyocytes et accumulent de devenir une signature d'ANT toxiques de longue durée dans le cœur (Spagnuolo *et al.*, 2011).

Des études antérieures ont montré que la doxorubicine provoque des réactions inflammatoires au voisinage des tissus cardiaques où il a été constaté pour augmenter l'incidence de la formation de thrombus dans l'oreillette de souris. Il induit également des effets inflammatoires dans le système vasculaire et le myocarde et élève les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (Flori *et al.*, 2011 ; Lamberti *et al.*, 2014).

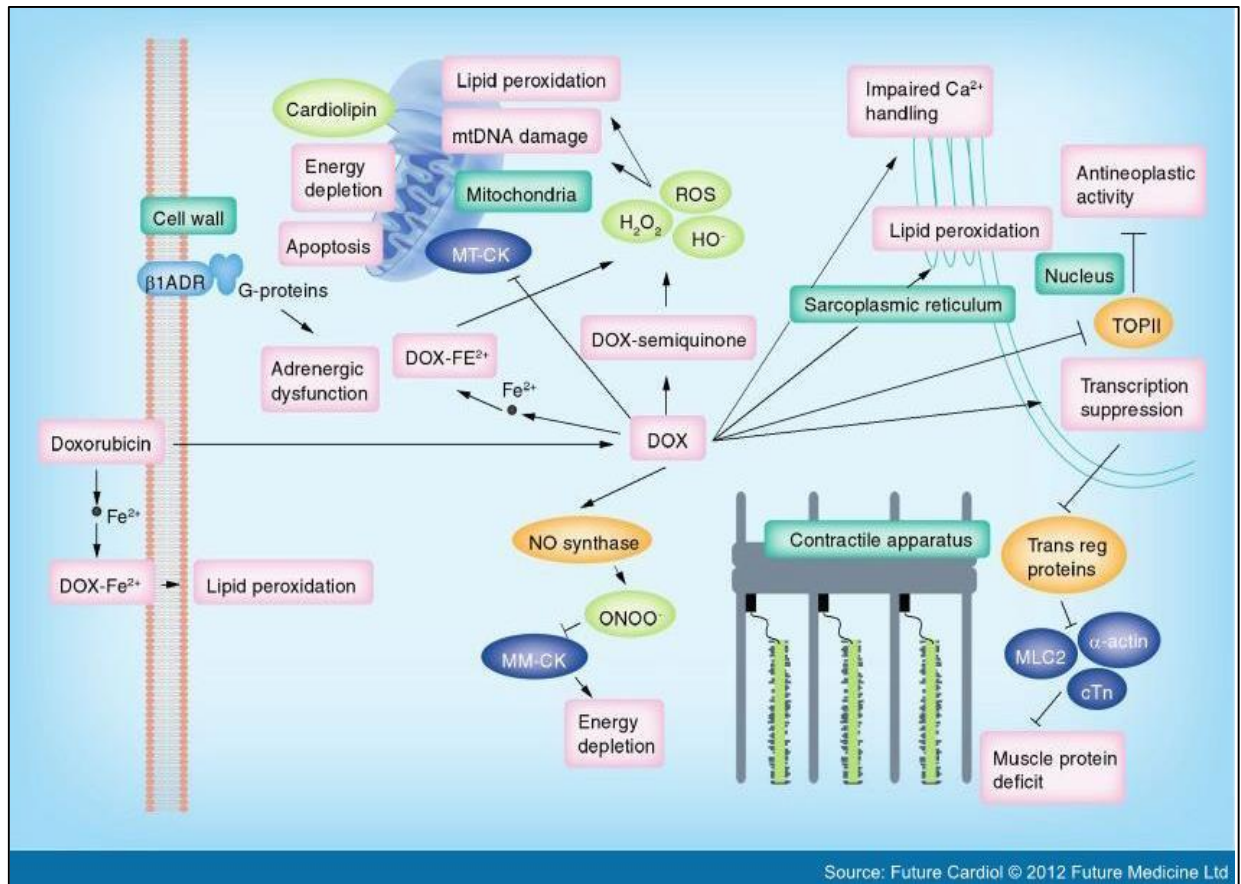


Figure 14 : Mécanisme de toxicité cardiaque de la doxorubicine dans les cardiomyocytes (Thannickal et Fanburg, 2000).

1.2. Apoptose cellulaire induite par les anthracyclines

Il est généralement admis que le stress oxydatif évoqué par la doxorubicine active la signalisation apoptotique conduisant à l'apoptose des cardiomyocytes, et que tant les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques sont impliquées. Un aperçu de toutes les voies apoptotiques impliqués dans la cardiotoxicité induite par la DOX est donné dans la (Figure 15). Il est également devenu évident que la doxorubicine peut induire l'apoptose par des mécanismes qui font impliquer directement la production de ROS et le stress oxydatif (Beom *et al.*, 2015).

Il a été suggéré, que l'apoptose induite par la DOX peut faire partie du mécanisme d'action cellulaire responsable de l'effet thérapeutique, la toxicité, ou les deux (Injac *et al.*, 2008). Les effets secondaires cardiaques des ANTs comportent deux mécanismes principaux, qui interagissent les uns avec les autres, le stress oxydatif et l'apoptose. La plupart des événements cellulaires induits par la production des ROS contribuent à la mort des cardiomyocytes, qui a été

Première partie : Synthèse bibliographique

montré pour être un mécanisme essentiel pour la cardiomyopathie induite par les ANTs. En effet, la perte des cardiomyocytes suite à l'activation des deux voies apoptotiques et nécrotiques fournit une explication attrayante pour la cardiotoxicité induite par les ANTs. Des études chez l'animal ont démontré que la mort cellulaire apoptotique se produit après une exposition *in vivo* à des ANTs. Des cultures des cellules expérimentales ont également montré que les ANTs induisent tous les deux la mort cellulaire apoptotique et nécrotique (Montaigne *et al.*, 2012).

En raison de la présence de mécanismes de défense antioxydants moins développés du cœur, ils sont particulièrement vulnérables à l'apoptose par les ROS induits par les ANTs (Momin *et al.*, 2011).

Les ROS qui sont produits par le métabolisme de la DOX provoquent la mort cellulaire par les voies apoptotiques. Plus précisément, le traitement avec la DOX provoque l'activation de la caspase 3 et la caspase 9, l'ouverture du pore mitochondrial de transition de perméabilité et la libération subséquente de cytochrome C dans le cytosol. En outre, la DOX se lie directement au phospholipide mitochondrial, la cardiolipine, ce qui perturbe la liaison de protéines de la membrane mitochondriale interne avec la cardiolipine, et qui peut améliorer la libération du cytochrome C, en réponse à un stress oxydant (Volkova et Russell, 2011). Il est également connu que le stress oxydatif induit par l'activation des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase), qui sont les voies intermédiaires primaires pour la signalisation d'induction de l'apoptose qu'est médiée en partie par l'activation de la MAPK p38 (Volkova et Russell, 2011 ; Rong *et al.*, 2015).

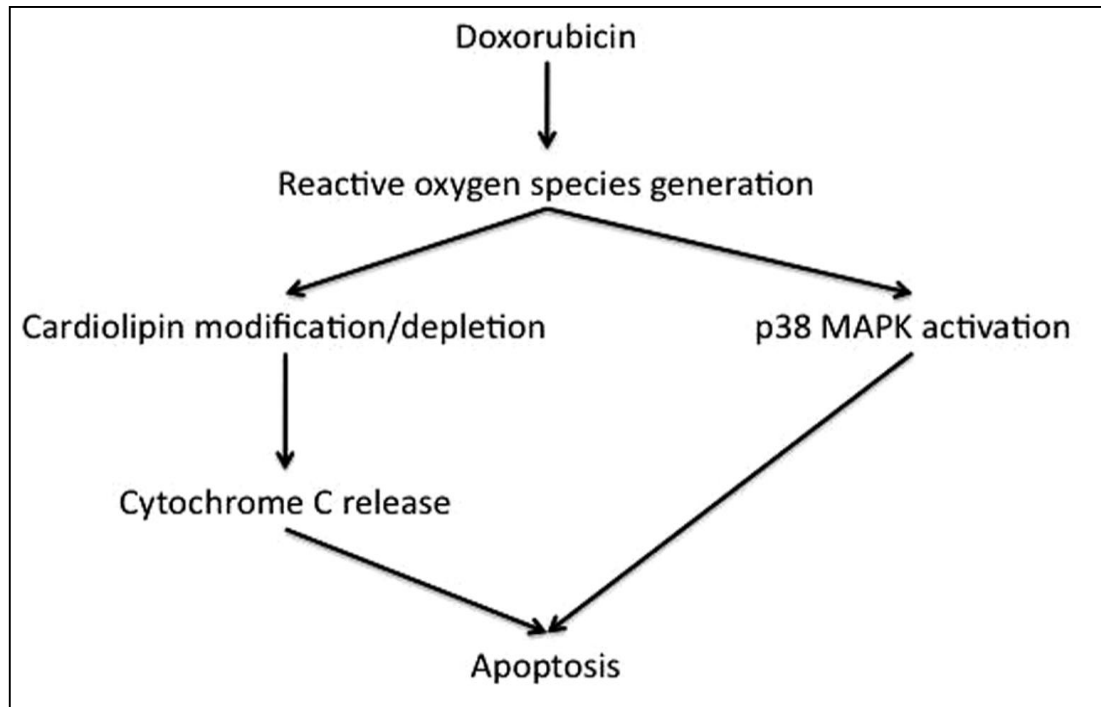


Figure 15 : Mécanismes cellulaires responsables de l'apoptose accrue dans les myocytes cardiaques par la doxorubicine (Volkova et Russell, 2011).

2. Hépatotoxicité induite par la doxorubicine

Pendant le traitement avec la DOX, le foie reçoit, accumule et métabolise des concentrations élevées de DOX. Par conséquent, il est prévisible que le foie est l'un des organes les plus affectés par le traitement avec la DOX. En effet, près de 40% des patients a subi des dommages du foie après un traitement avec la DOX (Zolfagharzadeh et Roshan, 2013). Alors que l'administration de la DOX aux rats diminue l'activité catalytique de plusieurs enzymes hépatiques du cytochrome P450 (Beshay *et al.*, 2011).

De même, l'hépatotoxicité induite par la DOX est généralement médiée par la production des radicaux libres (Beshay *et al.*, 2011) qui peut aller parfois à une cirrhose du foie (Petra *et al.*, 2014).

3. Néphrotoxicité induite par la doxorubicine

Bien que le mécanisme exact de la néphrotoxicité induite par la DOX demeure inconnue, il se peut qu'elle soit médiée par la génération des ROS, l'oxydation des protéines et la peroxydation lipidique (Rashikh *et al.*, 2012). Cependant, il a été suggéré par de nombreux chercheurs que les dommages cellulaires induits par la DOX est médié par la formation d'un radical libre

(anthracycline-fer) qui à son tour provoque des dommages graves à la membrane plasmique (Mansour *et al.*, 1999).

Dans des essais sur les animaux, la DOX a démontré une activité néphrotoxique et produit la maladie glomérulaire progressive chronique. Chez les rats atteints de néphropathie induite par la DOX, protéinurie massive associée à un gonflement et une vacuolisation des cellules épithéliales ont été signalés dans des expériences à court terme. De graves dommages rénaux, de vastes lésions glomérulaires, dilatation tubulaire, vacuolisation des glomérules rénaux, les dépôts de protéines en lumière tubulaire, et la fibrose du stroma ont été observés dans les études à long terme (Injac *et al.*, 2008). L'atteinte rénale la plus fréquente au cours du traitement anticancéreux est l'insuffisance rénale aiguë (IRA) caractérisée par une élévation rapide de la créatininémie (Vincent *et al.*, 2008).

IV. Polyphénols, Flavonoïdes

1. Définition

Ces dernières années, l'intérêt porte aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Popovici *et al.*, 2009).

Ces dernières années, la recherche appuie fortement sur le rôle des polyphénols dans la prévention des maladies dégénératives, en particulier des cancers, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives (Sahna *et al.*, 2003 ; Machado *et al.*, 2010). Les polyphénols sont des antioxydants puissants qui complètent et ajoutent aux fonctions de vitamines et enzymes antioxydantes comme moyen de défense contre le stress oxydatif causé par l'excès des ROS (Yilmaz *et al.*, 2006 ; Thippeswamy *et al.*, 2011 ; Teixeira *et al.*, 2017). Parmi les composés phénoliques on détecte une classe majeure qui sont les acides hydroxycinnamiques, largement distribués dans le règne végétal (Xiuzhen *et al.*, 2007).

Ainsi, on trouve les flavonoïdes qui sont un groupe de composés polyphénoliques, largement distribués à travers le règne végétal (Xiaoliang *et al.*, 2017). À ce jour, environ 3000 variétés de flavonoïdes sont connues. Beaucoup ont une faible toxicité chez les mammifères et certains d'entre eux sont largement utilisés en médecine pour le maintien de l'intégrité capillaire (Dumasa *et al.*, 2014) :

- Les Neoflavonoïdes ne sont pas souvent trouvés dans les plantes de nourriture, mais le dalbergin qui est le neoflavone le plus commun et le plus distribué dans le royaume des plantes (Garazd *et al.*, 2003).
- Les Chalcones d'anneau ouvert sont trouvées dans les fruits ainsi que dans les bières (Zhao *et al.*, 2005).

✓ **Flavones, Flavonols, flavanones**

Les Flavones sont structurellement très proches des flavonols, la différence provenant de l'absence de l'hydroxyle en C3. Les flavonols sont des composés flavonoïdes largement répandus. La myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempferol sont la plupart du temps présents sous forme d'O-glycosides, leurs conjugaisons est plus souvent en position 3 du noyau aromatique C, bien que des substitutions en positions 5, 7,4',3' et 5' soient possibles (Chira *et al.*, 2008).

Les flavanones sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes. Elles sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 (Figure 16) (Kawaii *et al.*, 1999 ; Grayer et Veitch, 2006 ; Chira *et al.*, 2008).

✓ **Les flavan-3-ols**

Les flavan-3-ols sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères (+) -catéchine et son isomère (-) -épicatéchine. Ces dernières formes les proanthocyanidines avec des couplages oxydatifs entre les positions C4 de l'hétérocycle et C6 ou C8 du monomère adjacent (Figure 16). Les oligomères de procyanidines sont formés de 2 à 5 unités de catéchines ou d'épicatéchines, les polymères étant formés de 6 unités ou plus. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés avec l'acide gallique ou bien hydroxylés pour former des gallo-catéchines (épicatéchine gallate, épigallo-catéchine, épigallo-catéchine gallate) et des gallo-tanins (Xiuzhen *et al.*, 2007 ; Chira *et al.*, 2008).

✓ **Les stilbéne**

Les stilbéne sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène, ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales, ce qui a été démontré pour le trans- resvératrol. Le resvératrol est synthétisé par la condensation du 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone. La réaction est catalysée par la stilbéne synthase, les produits impliqués étant les mêmes que pour la synthèse des flavonoïdes, la seule différence concernant

l'enzyme catalysant la réaction. Alors que le resveratrol se trouve dans les tissus végétaux principalement sous forme de trans-resveratrol-3-O-glucosides (Chira *et al.*, 2008).

✓ **Tanins**

Les tanins sont un groupe de polyphénols solubles dans l'eau, sont subdivisés en tanins condensés et hydrolysables, et on trouve couramment complexé avec des alcaloïdes, des polysaccharides et des protéines, en particulier celui-ci (Xiuzhen *et al.*, 2007).

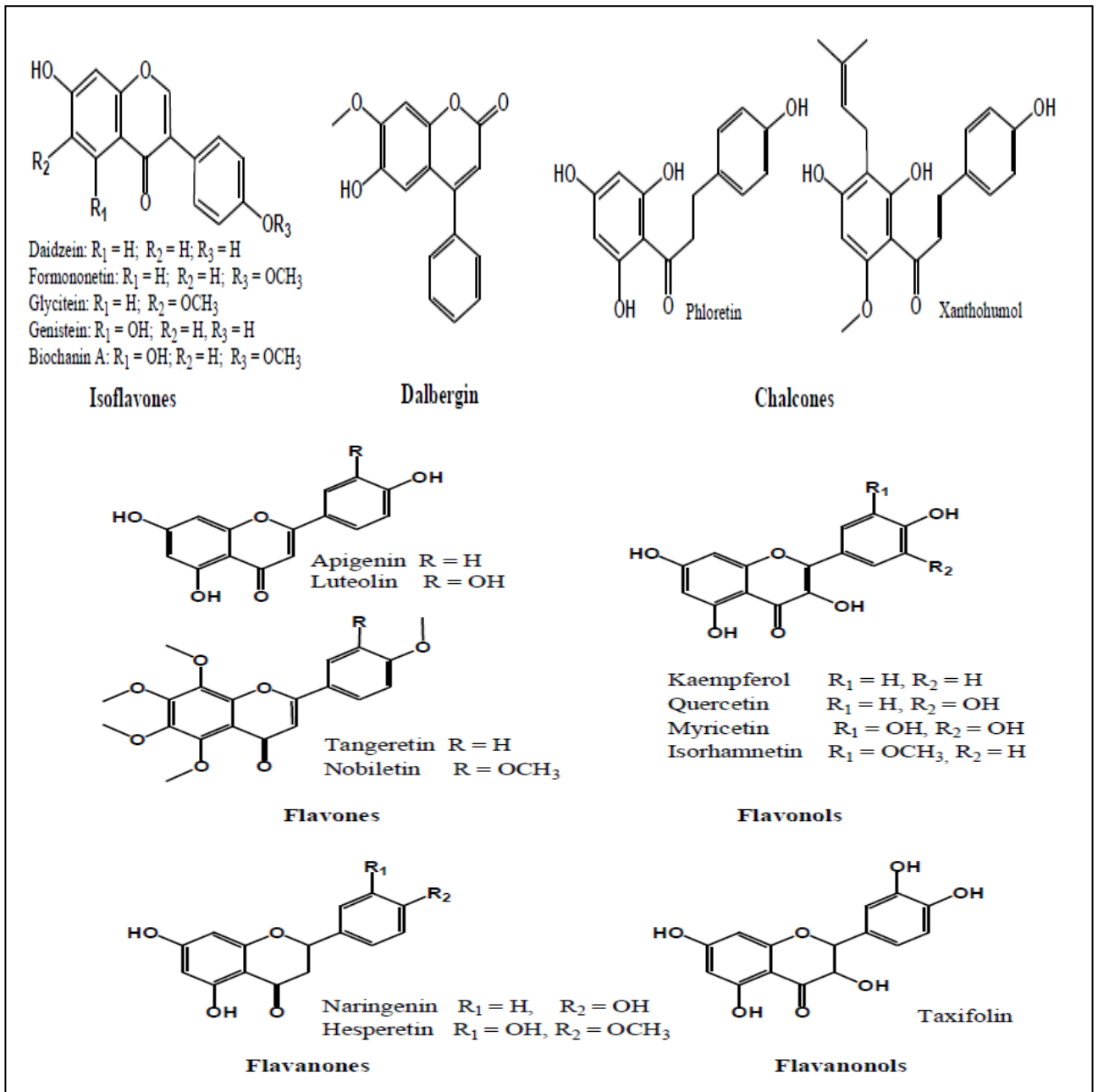


Figure 16 : La structure chimique des différents types des flavonoïdes (Tsao, 2010).

2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celles de l'acide shikimique conduisant après trans-amination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate) (Chira *et al.*, 2008 ; Kawaii *et al.*, 1999).

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone, en fonction de la nature, de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Chira *et al.*, 2008).

La biosynthèse des polyphénols complexes tels que les flavonoïdes est lié au métabolisme primaire à travers plastide et mitochondriales dérivés intermédiaires, chacun nécessitant l'exportation vers le cytoplasme où ils sont incorporés dans des parties distinctes de la molécule. Les trois unités malonyl-CoA sont ajoutées grâce à des réactions de condensation de décarboxylation séquentielle, qui initie la biosynthèse des flavonoïdes. Phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est une enzyme clé de la voie des phényl propanoïdes, qui catalyse la conversion de la phénylalanine à cinnamate, ce qui conduit alors à des structures en C6-C3 (Tsao, 2010).

3. Biodisponibilité des polyphénols

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans l'alimentation humaine, ils montrent une diversité structurelle considérable, ce qui influence largement leur biodisponibilité. La biodisponibilité semble différée grandement entre les différents polyphénols, et les polyphénols les plus abondants dans notre alimentation ne sont pas nécessairement celles qui conduisent aux plus fortes concentrations de métabolites actifs dans les tissus cibles. Les deux isoflavones et les acides phénoliques tels que l'acide caféique et l'acide gallique sont les mieux absorbés, suivis par les catéchines, flavanones et glucosides de quercétine, mais avec des cinétiques différentes. Une fois absorbé, les polyphénols sont conjugués à des groupes glucuronide, sulfate et de méthyle dans la muqueuse intestinale et tissus internes. Les polyphénols non conjugués sont pratiquement absentes dans le plasma. De telles réactions facilitent leur excrétion et de limiter leur toxicité potentielle. Les polyphénols atteignant le côlon sont largement métabolisés par la microflore dans un large éventail de poids d'acides phénoliques de faible masse moléculaire (Xiuzhen *et al.*, 2007).

3.1. Le métabolisme des flavonoïdes

L'absorption des flavonoïdes libérés de la nourriture par la mastication dépendra de ses propriétés physico-chimiques. Les flavonoïdes peuvent être absorbés par le petit intestin ou doit aller aux deux points avant l'absorption. Il peut dépendre de la structure du flavonoïde, c'est-à-dire, s'il est glycoside ou aglycone. Les flavonoïdes aglycones peuvent être facilement absorbés par le petit intestin, alors que les flavonoïdes glycosides doivent être convertis en forme aglycan (Hollman *et al.*, 1999).

Un mécanisme alternatif suggère que les flavonoïdes glucosides sont hydrolysés par l'hydrolase de phloridzin de lactase (LPH), et par b-glucosidase sur la membrane extérieure de la brosse de l'intestin grêle (le petit intestin). Plus tard, l'aglycone libérée peut être absorbé par lui-même (Day *et al.*, 2000).

Après absorption, les flavonoïdes sont conjugués dans le foie (Figure 17) où métabolisés à des plus petits composés phénoliques (Bravo, 1998). En raison de ces dernières réactions de conjugaison, aucuns flavonoïdes aglycones libres ne peuvent être trouvés en plasma ou urine, excepté la catéchine (Hollman, 2004).

Les flavonoïdes sécrétés avec la bile dans l'intestin et ceux qui ne peuvent pas être absorbé par l'intestin grêle sont dégradés dans les deux points par la flore microbienne intestinale qui décompose également la structure de l'anneau des flavonoïdes (Spencer, 2000).

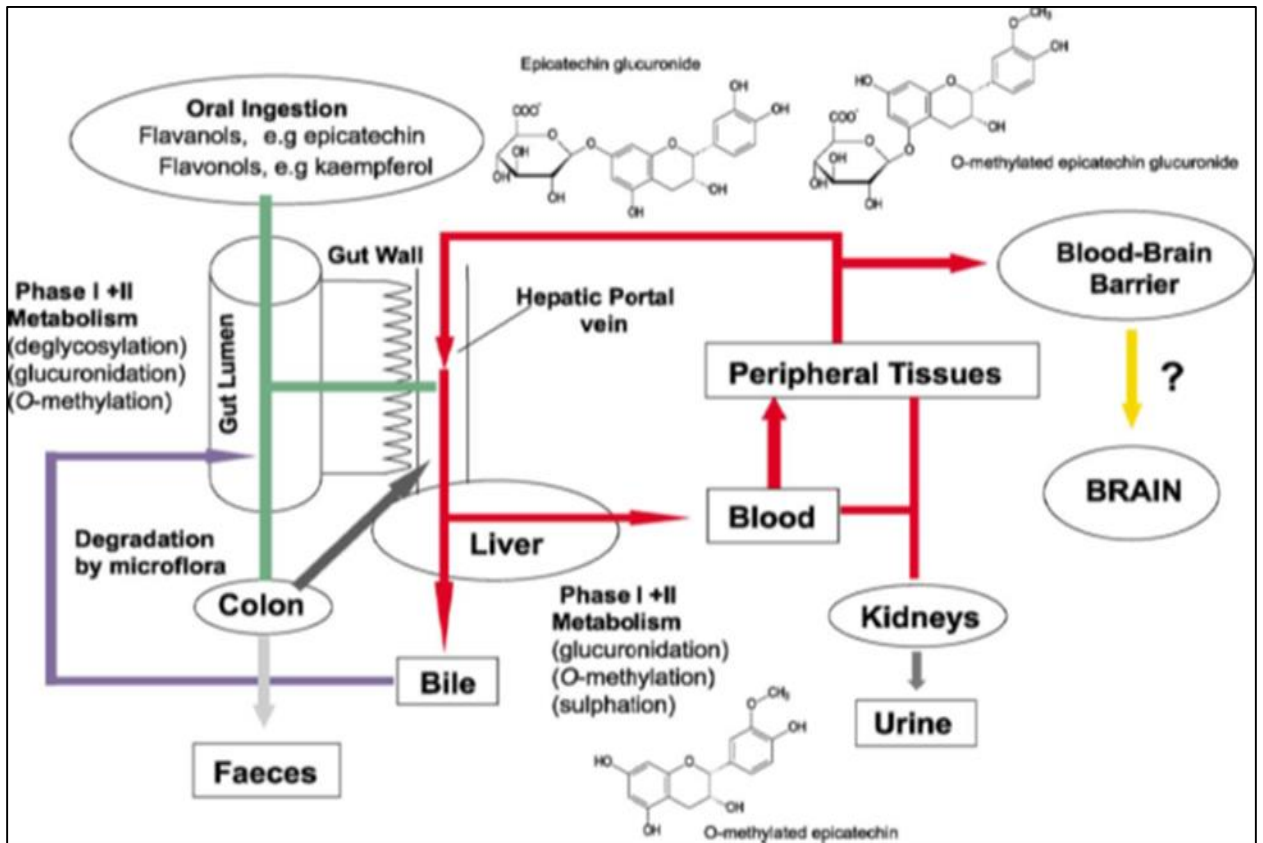


Figure 17 : Le métabolisme des flavonoïdes (Wilhelm *et al.*, 2002).

4. Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent plusieurs effets biologiques tels que anti-inflammatoire, anti actions hépatotoxiques et antiulcéreux. Ils inhibent aussi les enzymes telles que l'aldose réductase et de la xanthine oxydase. Ils sont des antioxydants puissants et ont des capacités de piégeage des radicaux (Dumasa *et al.*, 2014).

4.1. L'activité antioxydant

La production de radicaux libres dans les cellules animales peut être soit accidentelle ou délibérée. Avec l'acceptation croissante des radicaux libres comme lieu commun et des intermédiaires biochimiques importantes, ils ont été impliqués dans un grand nombre de maladies humaines (Narayana *et al.*, 2001). Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique, le tocopherol ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie, a la capacité de ces

composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes (Popovici *et al.*, 2009).

Les polyphénols peuvent induire des enzymes antioxydants telles que la glutathione peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase qui décomposent les hydroperoxydes, le peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes, respectivement (Tsao, 2010).

4.2. Activité antimicrobienne

Des flavonoïdes et des esters d'acides phénoliques ont été étudiés pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales. L'activité antibactérienne a été affichée par un certain nombre de flavonoïdes. (Narayana *et al.*, 2001).

4.3. Propriétés antimutagènes / anti cancérigènes

Les Polyphénols alimentaires peuvent moduler divers processus biochimiques impliqués dans la cancérogenèse. La Curcumin exerce des activités antitumorales par l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse, le blocage de la progression du cycle cellulaire tumorale, et l'induction de la mort cellulaire programmée *in vivo* et *in vitro* (Xiuzhen *et al.*, 2007).

4.4. L'activité anti inflammatoire

Le stress oxydatif induit par une inflammation est médié par l'activation de NF-kB. Il affecte une grande variété de processus de signalisation cellulaire conduisant à la production de médiateurs inflammatoires et de remodelage de la chromatine. Ce dernier permet l'expression de gènes pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-alpha) et iNOS. Il peut aussi provoquer une augmentation des enzymes telles que la cyclooxygénase (COX) et lipoxygénase (LPO), qui sont impliqués dans la libération des facteurs tels que les interleukines et chimiokines. Les effets indésirables du stress oxydatif ont été trouvés pour être commandé par les antioxydants et / ou anti-inflammatoires, et il a été démontré que les polyphénols, quercétine en particulier, inhibent la COX et LPO (Xiuzhen *et al.*, 2007).

L'EGCG, à différentes doses, réduit la peroxydation des lipides. Cependant, les catéchines suppriment l'activation du NF- kB par la répression de dégradation de l'unité d'inhibition I kB α , ce qui entrave la translocation nucléaire subséquente de la sous-unité fonctionnellement actifs de NF-kB. En outre, les catéchines gèrent la génération des ROS en inhibant les enzymes « prooxydant », tel que l'oxyde nitrique inductible synthase (iNOS) et de la xanthine oxydase, et en

induisant des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, CAT et GPX (Figure 18) (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

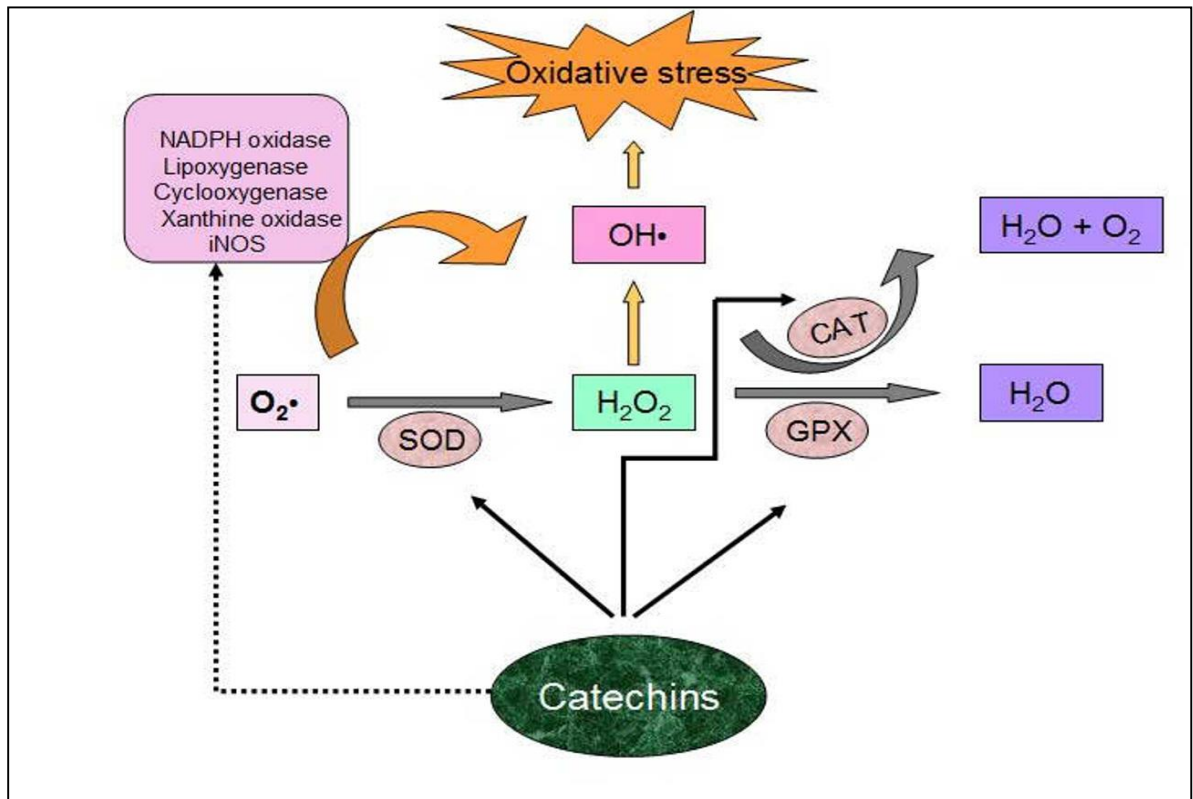


Figure 18 : mécanisme de défense de catéchines (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Flèche pointée indique l'inhibition, tandis que les flèches simples indiquent l'activation. Les catéchines activent des enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et Glutathion peroxydase (GPX), et inhibent les enzymes qui sont responsables du stress oxydatif telles que la NADPH-oxydase, la lipoxygénase, de la cyclooxygénase, de la xanthine oxydase et de l'iNOS (inductible l'oxyde nitrique synthase).

4.5. Activité Hepatoprotective

Les anthocyanines ont un grand effet préventif contre les diverses maladies, il a été démontré que l'anthocyanine cyanidin-3-O- β -glucoside (C3G) augmente l'expression de la glutamate-cystéine ligase catalytique Gclc hépatique par l'augmentation des niveaux de l'AMPc pour activer la protéine kinase A (PKA), qui à son tour régule la phosphorylation d'AMPc l'élément de réponse qui lie les protéines (CREB) pour promouvoir CREB-DNA-binding et augmenter l'expression de Gclc qui entraîne une diminution dans les niveaux des ROS et la signalisation pro-apoptotique (Zhu *et al.*, 2012).

La Silymarine a des applications cliniques dans le traitement de la cirrhose, des dommages ischémiques, et de l'hépatite toxique induites par de diverses toxines comme acétaminophen, et les champignons toxiques (Saller *et al.*, 2001).

5. Description botanique du genre *Helianthemum*

Helianthemum est un genre botanique appartenant à la famille des Cistaceae qui contient plus de 110 espèces qui se répartissent en majorité dans le bassin méditerranéen, encore assez bien représenté dans le Sahara septentrional. Les *Helianthemum* sont des arbustes souvent très petits, à feuilles opposées ou rarement alternes à fleurs jaunes ou jaunâtre portant 5 sépales dont deux plus petits, un ovaire formé de 3 carpelles soudés et coiffé d'un style unique coudé (Figure 19) (Benabdelaziz *et al.*, 2015).



Figure 19 : Le genre *Helianthemum* (Cistaceae).

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Helianthemum>.

5.1 Les espèces *Helianthemum confertum* et *ruficomum*

L'espèce *H. confertum* comprend des sépales ovales ou ovales-lancéolés, s'atténuant graduellement en pointe aigue et un peu allongée, intérieurement à soies apprîmes. Plante à tige ligneuses dressées pouvant atteindre 150 cm. Capsule mure plus courte que les sépales. Alors que l'espèce *H. ruficomum* contient des feuilles petites (1.20 cm de long au plus), les inférieures obovales, les supérieures linéaires ou linéaires-lancéolées. Sépales présentant sur les nervures des poils raides et naissant en faisceau d'un tubercule. Calice nettement tordu. Feuilles vertes en dessus et canescentes en dessous. Grappes simple ou le plus souvent, géminée (Chemam, 2017).

5.2. Classification botanique des deux plantes

Dans cette étude on a utilisé les extraits butanoliques des plantes *H. ruficomum* et *H. confertum*. Ces espèces sont récoltées dans le sud-ouest d'Algérie durant le mois de mai 2012 et identifiées par le professeur Mohamed Benabdelhakem, le directeur de l'agence de protection de la nature de Bechar. (Quezel et Santa, 1963). La classification botanique des deux plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* est illustrée dans (le tableaux 3) en dessous :

Tableau 3 : Classification systématique des deux plantes *H. confertum* et *H. ruficomum*.

Règne	Plantae	Plantae
Sous-règne	Viridaeplantae	Viridaeplantae
Division	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Class	Equisetopsida	Equisetopsida
Sous-classe	Magnoliidae	Magnoliidae
Ordre	Malvales	Malvales
Famille	Cistaceae	Cistaceae
Genre	Helianthemum	Helianthemum
Espèce	<i>Helianthemum confertum</i>	<i>Helianthemum ruficomum</i>

5.3 Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Helianthemum*

Des études préalables sur cette genre ont conduit à l'isolement à des nouvelles molécules qu'est l'acide para-hydroxy benzoïque et la lavandoside. L'isolement de flavonoïdes d'aglycones, de glucosides flavonoïdes et de lignanes a également été rapportée. (Chemam, 2017).

5.4 Activité biologique du genre *Helianthemum*

Toutes les espèces de la famille Cistaceae sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire, antifongique, antiulcéreux, antioxydante (Benabdelaziz *et al.*, 2017). Ainsi, la médecine traditionnelle mexicaine utilise une grande variété de plantes dans le traitement des troubles gastro-intestinaux tels que la diarrhée (Angela *et al.*, 2013).

Première partie : Synthèse bibliographique

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

I. Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal et l'étude phyto-chimique

1.1. Préparation des extraits

L'extraction des feuilles et des fleurs des deux plantes a été effectuée selon le protocole utilisée habituellement dans le laboratoire (Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Département de Chimie, Université Frères Mentouri, Constantine 1) (Figures 20 et 21).

L'extraction est réalisée par Mademoiselle CHEMAM Yasmine, doctorante en chimie.

✓ *Helianthemum confertum*

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

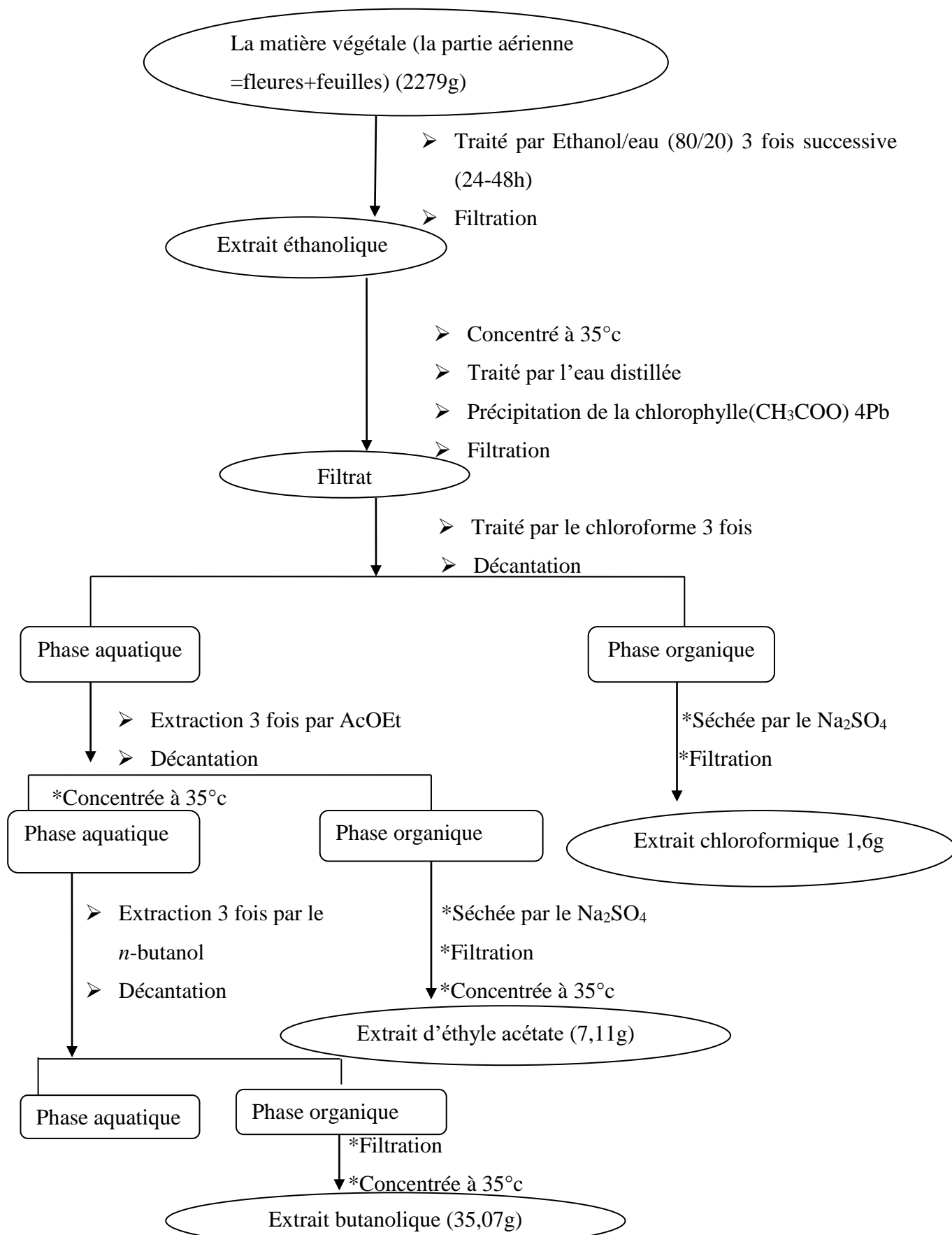


Figure 20 : Protocole d'extraction de la plante *H. confertum*.

✓ *Helianthemum ruficomum*

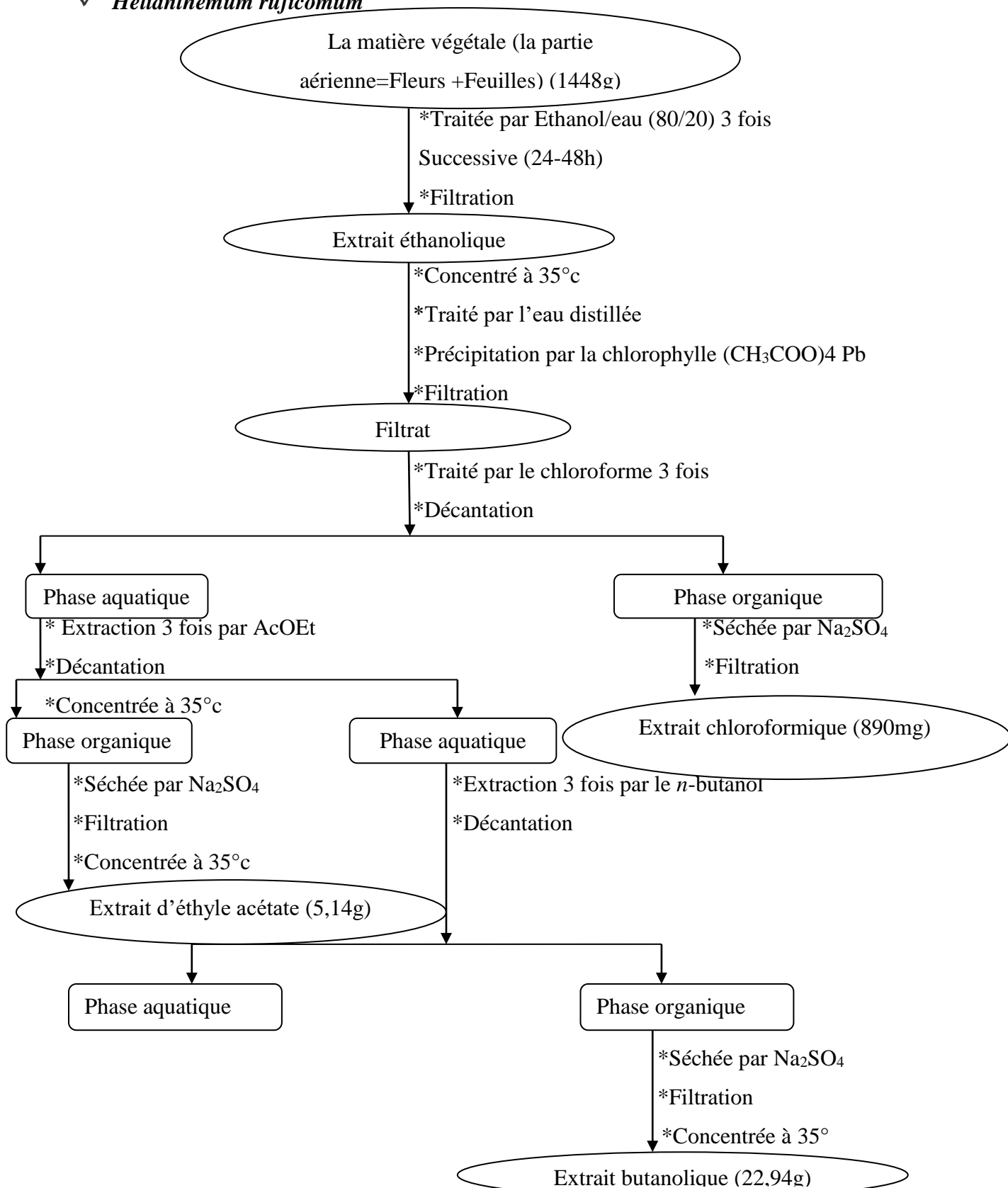


Figure 21 : Protocole d'extraction de la plante *H. ruficomum*.

2. Etude phyto-chimique

2.1. Détermination de la teneur totale des deux extraits en phénols

La teneur totale en phénols dans les deux extraits des plantes *H. ruficomum* et *H. confertum* a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton *et al.*, (1999). Les extraits sont solubilisés dans le méthanol (MeOH) à une concentration de 1mg/mL. A chaque 20 µl des solutions d'extraits préparés, 100 µl de Folin-Ciocalteu et 1580 µl d'eau distillée ont été ajoutés successivement. Trois minutes plus tard, on ajoute 300 µl de carbonate de sodium (20 %). Les tubes à essai ont été secoués pendant 2 h à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzu, Kyoto, Japan). La concentration des composés phénoliques totaux a été déterminée en µg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante de la courbe étalon d'acide gallique (annexe).

$$\text{Absorbance} = 0.001 \times [\text{acide gallique}]$$

2.2. Détermination de la teneur totale des deux extraits en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes dans les extraits butanolique des deux plantes a été déterminée selon la méthode de Ordonez *et al.*, (2006). A chaque 0.5 ml des extraits préparés dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml, 0.5 ml d'AlCl₃ à 2% a été ajouté. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. La concentration des flavonoïdes a été déterminée en µg d'équivalent de quercétine (QE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante du courbe étalon de la quercétine (annexe).

$$\text{Absorbance} = 0.034 \times [\text{quercétine } (\mu\text{g})] + 0.015$$

2.3. Evaluation du pouvoir antiradicalaire (DPPH')

La capacité des extraits butanolique des deux plantes à piéger le radical DPPH' (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été évaluée par la méthode de Braca *et al.*, (2001). Tout d'abord, le DPPH', la vitamine C et les deux extraits sont préparés préalablement dans le méthanol. Ensuite, 3 ml de solution de DPPH' (0.004%) a été ajouté à des concentrations croissantes (1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75µg/ml) d'extraits ou de la vitamine C préparés dans le méthanol. Les essais ont été effectués en triple. Les tubes à essai des échantillons ont été incubés dans l'obscurité et à une température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été ensuite mesurée à 517 nm. La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'activité de piégeage de DPPH (I %) a été calculé en utilisant l'équation :

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

$$I \% = [(A0-A1) / A0] \times 100.$$

A0 : Absorbance de la solution de DPPH^{*} seule

A1 : Absorbance de la solution de DPPH^{*} + l'extrait ou de la vitamine C.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) des deux extraits et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} (I %) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

2.4. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La capacité des extraits des deux plantes à inhiber la peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage de la concentration de (MDA), qui résulte de la peroxydation lipidique suivant la méthode de Banerjee *et al.*, (2005) qui est basée sur la réaction de jaune d'œuf et l'acide thiobarbiturique. A 0.5 ml d'homogénat de vitellus d'œuf à 10%, 50 µl de FeSO₄ (0.07 M) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé ensuite avec des concentrations croissantes des deux extraits ou de la vitamine C (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) à 37 ° C pendant une heure.

Après incubation, on ajoute successivement 1 ml de TCA 20% (acide trichloracétique) et 1.5 ml de TBA 1% (acide thiobarbiturique). Les échantillons ont été mélangés puis incubés une deuxième fois pendant 15 minutes à 95°C.

Après centrifugation des échantillons à 400 g pendant 20 min, les substances réactives thiobarbituriques résultantes (TBARS) ont été mesurées dans le surnageant à 532 nm.

La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (I %) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$I \% = [(A0-A1) / A0] \times 100.$$

A0 est l'absorbance de témoin (sans extrait ou vitamine C) et A1 est l'absorbance de l'échantillon + de l'extrait ou de la vitamine C.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) des deux extraits des deux plantes et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (I %) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

2.5. Etude de l'effet des extraits des plantes sur des lignes cellulaires cancéreuses *in vitro*

L'activité anticancéreuse des extraits a été évaluée sur des lignes cellulaires HeLa (human cervix carcinoma) et HT29 (human colorectal adenocarcinoma). Cette activité a été évaluée par l'analyseur de cellules en temps réel xCELLigence (RTCA) dans les laboratoires Plant Research à l'université de Çankiri en Turquie.

✓ Culture des cellules et préparation de la suspension cellulaire

Les lignes cellulaires HeLa (human cervix carcinoma) et HT29 (human colorectal adenocarcinoma) ont été cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ dans un milieu d'aigle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma), supplémenté avec 10% du sérum foetal bovin (FBS) (Sigma, Allemagne) et 2% d'une solution pénicilline/streptomycine (Sigma, Allemagne) dans des boîtes de Pétri pour culture cellulaire, stériles. Toutes les cellules ont été soumises à des passages par trypsinization lorsqu'elles atteignent 70-80% de confluence.

Lors de l'expérience, les cellules HeLa et HT29 ont été détachées du fond des boites de culture par 10 ml d'une solution de trypsine-EDTA. Après le détachement des cellules, la trypsinization est arrêtée par 10 ml de milieu de culture et mélanger soigneusement. Les suspensions ont été transférées dans deux tubes coniques et placés dans la centrifugeuse. Le surnageant est aspiré par vacuum et les cellules qui restent au fond des tubes sont diluées dans 4 ml de milieu. La concentration cellulaire de chaque suspension obtenue a été mesurée par CEDEX HiRes compteur des cellules qui utilise le bleu de Trypan.

✓ Préparation des extraits

Les extraits sont préparés dans le diméthylfoxyde (DMSO) à une concentration de 20mg/ml puis stockés à 4°C dans l'obscurité.

✓ Traitement des cellules par les extraits et mesure de la prolifération cellulaire

Avant de commencer la manipulation, la hotte de culture cellulaire ainsi que les matériels qui y seront utilisés dedans doivent être stérilisés par l'éthanol à 70% pour éviter la contamination.

Une plaque 96 puits stérile a été utilisée. Premièrement on a ajouté 50 µl du milieu de culture DMEM dans tous les puits de la plaque et on la laissée dans la hotte pendant 15 minutes, puis dans l'incubateur à CO₂ pendant 15 minutes supplémentaires. Après ce temps, une mesure de nombre des cellules a été effectuée pour confirmer que le milieu nutritionnel n'est pas contaminé par des cellules. Ensuite, on a ajouté 100 µl de la suspension cellulaire (2.5 x 10⁴ cellules/100 µl) dans les tous les puits de la plaque à l'exception les trois derniers qui sont utilisés comme contrôle négative (contiennent du milieu de culture sans cellules). La plaque est laissée dans la

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

hotte pendant 30 min. Ensuite, la plaque a été insérée dans l'instrument xCELLigence dans l'incubateur à CO₂ et une mesure a été effectuée pendant 80 min (Abay *et al.*, 2015). Après, 50-20 et 10µl de la solution d'extrait (dissoudre au DMSO) sont ajoutés dans les puits respectivement pour les doses 250-100 et 50µg/mL. A la fin, le volume final a été complété dans les puits à 200 µl avec du milieu de culture DMEM. Trois puits avec des cellules HeLa et HT29 non traitées, utilisées comme contrôle positif.

La plaque a été insérée ensuite dans l'instrument xCELLigence dans l'incubateur pendant 51 h. La prolifération des cellules en présence et en absence des extraits est mesurée par xCELLigence durant toutes les 51 h et suivi à l'aide d'un ordinateur lié à l'instrument.

3. Expérimentations animales

3.1. Effet préventif de la plante *Helianthemum confertum* sur la toxicité aigüe induite par la doxorubicine (10mg/kg)

Dans cette étude, les rats mâles de la souche *Wistar albinos* (Institut Pasteur, Alger) pesant entre (200-250g) sont utilisés. Dès leurs réceptions, les rats sont divisés en groupe de 6 rats dans des cages standards pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans des différentes expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger), ils sont maintenus dans une animalerie à une température constante (22 ± 2) °C à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Ces expériences ont toujours lieu de 8h à 10h du matin.

Pour évaluer l'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Helianthemum confertum* sur les rats durant 10 jours. Les rats sont répartis en six groupes de 7 rats chacun de la manière suivante :

Groupe témoin : non traité.

Groupe EXT 50mg/kg : reçoit l'extrait par gavage à la dose (50mg/kg) pendant 10 jours.

Groupe EXT 100mg/kg : reçoit l'extrait par gavage à la dose (100mg/kg) pendant 10 jours.

Groupe DOX : reçoit une seule injection intrapéritonéale (10mg/kg) au 7^{ème} jour (Ashour *et al.*, 2011).

Groupe DOX-EXT 50mg/kg : traités avec l'extrait par gavage à la dose (50mg/kg) pendant 10 jours et d'une seule dose de DOX par voie intrapéritonéale à la dose de (10mg/kg) au 7^{ème} jour.

Groupe DOX-EXT 100mg/kg : traités avec l'extrait par gavage à la dose (100mg/kg) pendant 10 jours et d'une mono prise de DOX par voie intrapéritonéale à la dose de (10mg/kg) au 7^{ème} jour.

3.2. Effet préventif de la plante *Helianthemum ruficomum* sur la toxicité aigüe induite par la doxorubicine (15mg/kg)

Pour évaluer l'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* sur les rats durant 10 jours. Nous avons huit groupes comportant 7 rats chacun de la manière suivante :

Groupe témoin : non traité

Groupe EXT 50mg/kg : reçoit l'extrait par gavage à la dose (50mg/kg) pendant 10 jours.

Groupe EXT 100mg/kg : reçoit l'extrait par gavage à la dose (100mg/kg) pendant 10 jours.

Groupe DOX : reçoit une seule injection intrapéritonéale (15mg/kg) au 7^{ème} jour (Ashour *et al.*, 2011).

Groupe DOX-EXT 50mg/kg : traités avec l'extrait par gavage à la dose (50mg/kg) pendant 10 jours et d'une seule dose de DOX par voie intrapéritonéale à la dose de (15mg/kg) au 7^{ème} jour.

Groupe DOX-EXT 100mg/kg : traités avec l'extrait par gavage à la dose (100mg/kg) pendant 10 jours et d'une seule dose de DOX par voie intrapéritonéale à la dose de (15mg/kg) au 7^{ème} jour.

Groupe vit E : traités par la vit E par gavage à la dose (100mg/kg) pendant 10 jours.

Groupe vit E-DOX : traités avec la vit E par gavage à la dose (100mg/kg) pendant 10 jours et d'une seule dose de DOX par voie intra péritonéale à la dose de (15mg/kg) au 7^{ème} jour.

3.2.1. Dissection des rats, prélèvement du sang et des organes

Après les différents traitements, les rats sont décapités par dislocation cervicale et la collecte du sang s'effectue à partir de la veine porte dans des tubes héparines, puis il est centrifugé à 3000 tours/10 min pour récupérer le sérum. Les activités enzymatiques d'AST et d'ALT (qui sont des biomarqueurs de la fonction hépatique) sont mesurées. Aussi bien les biomarqueurs de la fonction rénale (l'urée et la créatinine) et le biomarqueur de la fonction cardiaque (LDH) ont été estimés. Les paramètres cités précédemment sont déterminés par des méthodes colorimétriques en utilisant des Kits commerciale (Spinreact, Espagne).

3.2.2. Préparation d'homogénat et de cytosol

Après le sacrifice des rats, une perfusion aura lieu avec une solution froide de KCL (1.15%) afin de drainer tout le sang restant dans les organes. En suite les organes sont coupés en petits morceaux, pesés, homogénéisés pour doser l'MDA, le GSH et l'activité enzymatique de GPx. L'homogénat est centrifugé pendant 45 min à 4°C pour obtenir le surnageant qui sera utilisé comme une source de CAT. Le dosage des protéines dans les fractions cytosoliques est réalisé par la méthode de Lowry (1951).

3.2.3. Evaluation biochimique et mesure des paramètres de stress

3.2.3.1. Dosage de TGO, TGP au niveau du plasma

Le dosage des indicateurs de la fonction hépatique AST et ALT est réalisé selon la méthode de (Bergmeyer *et al.*, 1987).

3.2.3.2. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol est réalisé selon la méthode de Naito (1984). Ce dosage est basé sur la transformation des esters de cholestérol au cholestérol libre, ensuite leur oxydation donne la naissance de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui réagit avec le phénol et le 4-Aminophenazone dont la présence de l'enzyme de peroxydase pour donner un composant de couleur rose. Leur densité augmente proportionnellement avec la concentration de cholestérol dans l'échantillon à 505 nm.

3.2.3.3. Les triglycérides

Le dosage des triglycérides est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne) et selon la méthode enzymatique et colorimétrique de Fossati et principe (1982). Les triglycérides incubés avec de la lipoprotéïnase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par la glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par le GPO. Au final, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) réagit avec du 4-aminophénazone (4- AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon à 505 nm.

3.2.3.4. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée se fait à l'aide de la méthode de Balleterl *et al.*, (1961). Le sérum traité par l'enzyme de l'Urease libère le carbonate et l'ammonium. Les ions de l'ammonium résultent vont réagir avec le Salicylate et l'Hypochlorite de sodium, composant un complexe coloré en vert leur densité lue à 590 nm.

3.2.3.5. Dosage de la créatinine

La créatinine est dosée selon la méthode de Spierto *et al.*, (1979). Dans un milieu basique, en utilisant l'acide picrique qui va réagir avec la créatinine pour former un complexe coloré, sa densité lue à 510 nm.

3.2.3.6. Dosage de MDA au niveau d'homogénat

La peroxydation lipidique est estimée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Uchiyama et Mihara (1978). L'MDA est l'un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) par les radicaux libres libérés au cours de stress. En milieu acide et à chaud (100°C) une molécule d'MDA est condensée avec deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose. Le principe de cette méthode est résumé dans la figure ci-dessous (Figure 22) :

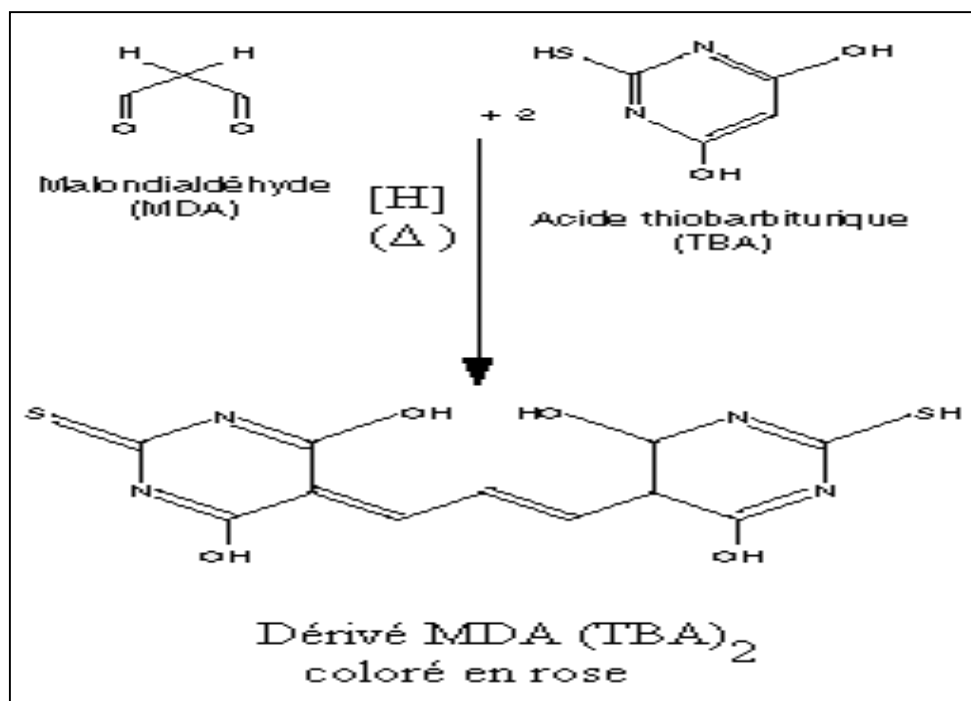


Figure 22 : Principe de dosage du malondialdéhyde.

La densité optique du complexe formé entre le MDA de l'échantillon et le TBA est mesurée à 532 nm et la concentration du MDA est exprimée en nmol/g tissu.

3.2.3.7. Dosage de glutathion (GSH)

Le dosage du GSH est réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Son principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5,5'-Dithiobis2-nitrobenzoïque (DTNB), libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante (Figure 23) :

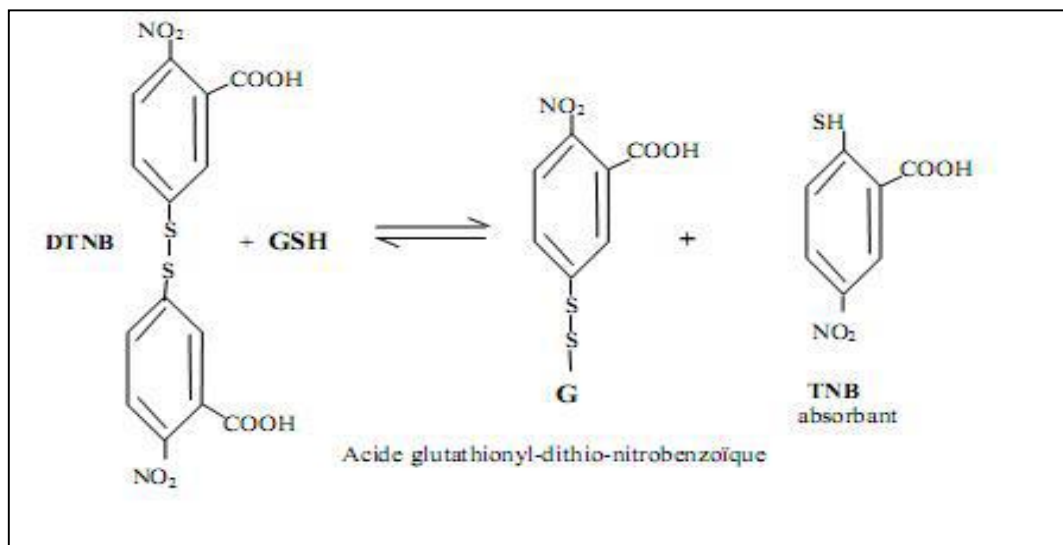
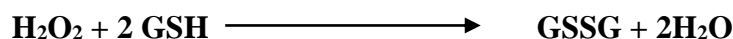


Figure 23 : Principe de dosage de glutathion.

Les concentrations sont exprimées en nmol/gramme d'organe.

3.2.3.8. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



La densité optique a été mesurée à 412 nm et l'activité de l'enzyme GPx a été exprimée en $\mu\text{mol GSH} / \text{mg protéine}$.

3.2.3.9. Evaluation de l'activité enzymatique du catalase (CAT)

L'activité de la catalase a été estimée selon la méthode de Claiborne, (1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) du fait de l'activité de la catalase présente dans l'échantillon selon la réaction suivante :



Un volume de 25 μl du cytosol a été mélangé avec 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 975 μl du peroxyde d'hydrogène (0.019 M). La densité optique a été mesurée trois fois successive chaque 60 secondes à 560nm. L'activité de la catalase a été exprimée en unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon l'équation suivante :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2) / \text{g de protéine}$$

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

La concentration cytosolique des protéines est évaluée par la méthode de Lowry (1951). Sous les mêmes conditions, une gamme étalon est établie en utilisant (0 à 0,5 mg) de protéine avec le sérum albumine bovine. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

3.2.3.10. Dosage de protéine total

Le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode de Biuret en utilisant un kit commercial (Spinreact, Espagne). Les protéines de l'échantillon donnent une couleur violette/bleue avec le réactif de Biuret. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon.

3.2.4. Etude histologique

Après le sacrifice des animaux et leurs dissections, une perfusion aura lieu avec une solution froide de KCL (1.15%) afin de drainer tout le sang restant dans les organes. Les organes sont immédiatement prélevés (le foie et les reins) coupés en petits morceaux, et conservés dans le fixateur formol (10%) Les fragments des organes sont déshydratés par submersion en utilisant des bains d'éthanol à des concentrations allant en ordre croissant. Après déshydratation par l'éthanol, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue durant 24 heures pour chacun. Le xylène occupe la place de l'eau pour faciliter la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. Les échantillons des foies et des reins sont placés dans des moules (barres de Leucart) et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe.

- **Réalisation des coupes et coloration** : les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 5µm d'épaisseur. A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine qui sont ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure. Après rinçage par l'eau distillée, les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline pour colorer les noyaux. Elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (8 min) pour colorer le cytoplasme. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et prêtes à l'observation microscopique (objectif x 10 et x 40).

L'étude histologique s'effectue dans les laboratoires d'anatomie pathologique de la cité El-Bir Constantine.

3.2.5. Etude statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test t de Student. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

ns ; $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

* ; $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative.

** ; $0,05 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative.

*** ; $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

II. Résultats et discussion

II.1. Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vitro*

1. Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes

Ces dernières années, l'intérêt des propriétés thérapeutiques des antioxydants naturels a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs origines tel que : les plantes médicinales. La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphenoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres comme les radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}) et superoxydes (O_2^{\bullet}) (Popovici *et al.*, 2010).

Les résultats de dosage des polyphénols révèlent que les extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* contiennent une grande quantité des phénols totaux $263,33 \pm 19,85 \mu\text{g}$ et $179,5 \pm 2,12 \mu\text{g}$ d'équivalent d'acide gallique/mg de l'extrait (Figure 24).

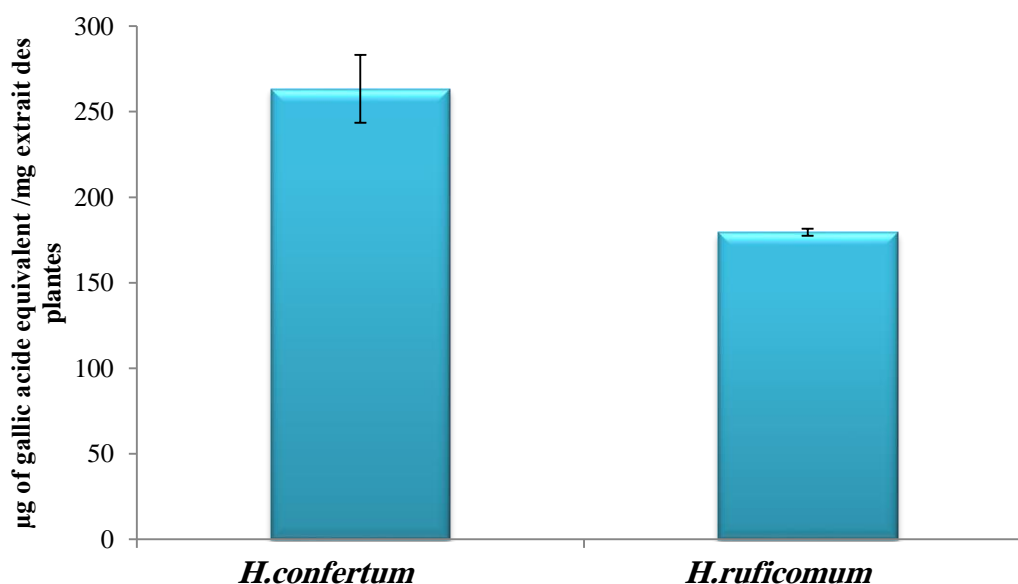


Figure 24 : La teneur en phénols totaux des deux extraits butanoliques des plantes *H. ruficomum* et *H. confertum*.

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

L'évaluation quantitative des flavonoïdes (la quercétine comme standard) montre que les extraits butanoliques des plantes *H. ruficomum* et *H. confertum* contiennent des quantités importantes des flavonoïdes $44,01 \pm 3,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ et $25,35 \pm 0,96 \mu\text{g}/\text{mg}$ (Figure 25).

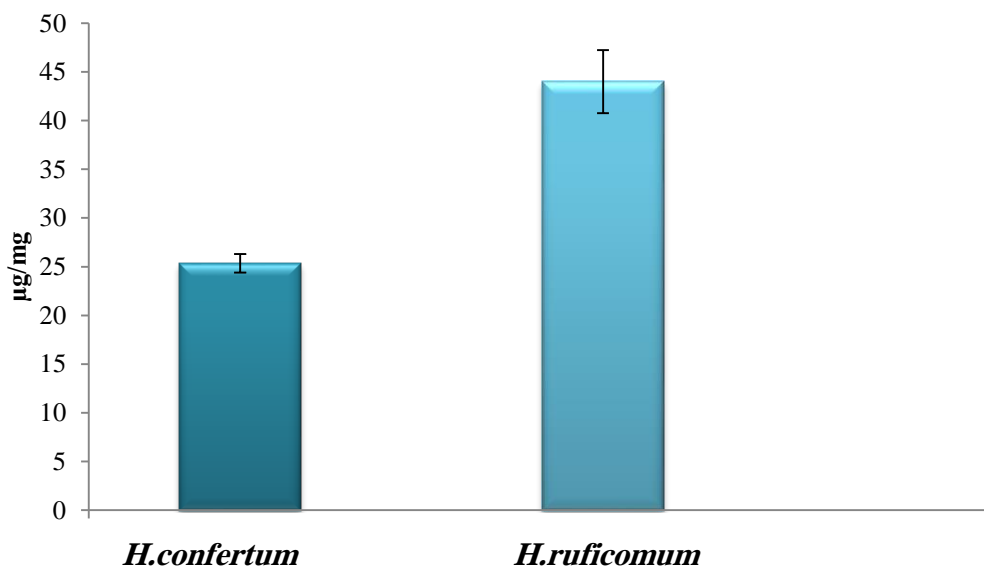


Figure 25 : La teneur en flavonoïdes des deux extraits butanoliques des plantes *H. ruficomum* et *H. confertum*.

2. Evaluation du pouvoir anti radicalaire

L'activité anti radicalaire des deux plantes vis-à-vis du radical DPPH[•] a été évaluée dans les extraits butanoliques.

Les résultats obtenus dans cette méthode montrent que les extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* ont une capacité de donner l'hydrogène au radical DPPH[•]. Une diminution dose-dépendante du radical DPPH[•] a été observée lors du traitement. On observe que les deux extraits ont des capacités de piéger le radical DPPH avec une IC50 équivalente à $26,27 \pm 0,73 \mu\text{g}/\text{ml}$ et $32,05 \pm 1,87 \mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement (Figure 26).

Les figures (27, 28) indiquent qu'il y a une augmentation significative du pourcentage de piégeage du radical DPPH[•].

Le pouvoir antiradicalaire, (50%) de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* est observé avec une dose de $12,81 \mu\text{g}/\text{ml}$ et un pouvoir équivalent à celui qu'exerce l'extrait

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

butanolique de la plante *H. confertum* (49,84%) à la concentration 25 μ g/mL. Donc, 50% des radicaux DPPH \cdot ont été piégés avec seulement 12,81 μ g /ml et 25 μ g/ml pour les deux plantes respectivement. Par contre le pouvoir de la vitamine C est de 95% à la dose 5 μ g/mL. Les résultats obtenus indiquent que les deux extraits butanoliques des plantes ont un effet anti radicalaire dose-dépendante. Cet effet est dû grâce aux constituants phénoliques comme les flavonoïdes et les acides phénoliques qui sont capables de piéger les radicaux libres.

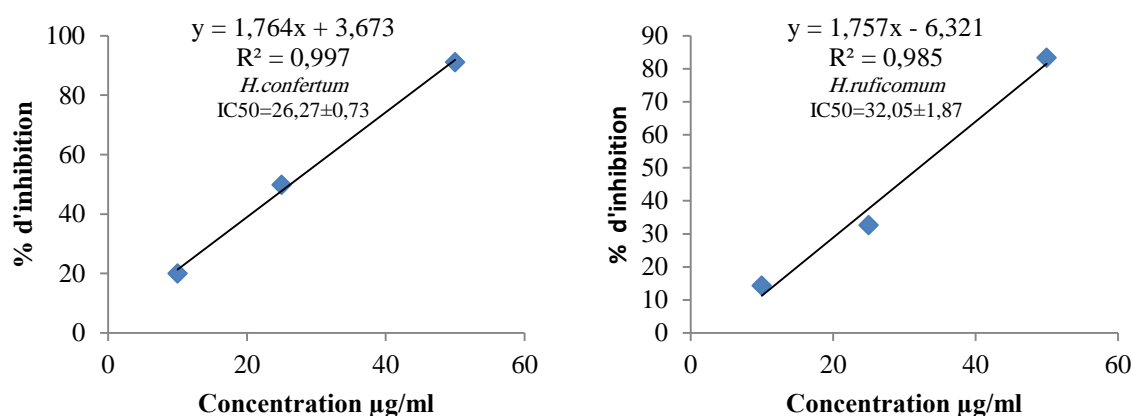


Figure 26 : Le pouvoir anti radicalaire des extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* à différentes concentrations (IC50) (moyenne de trois répétition).

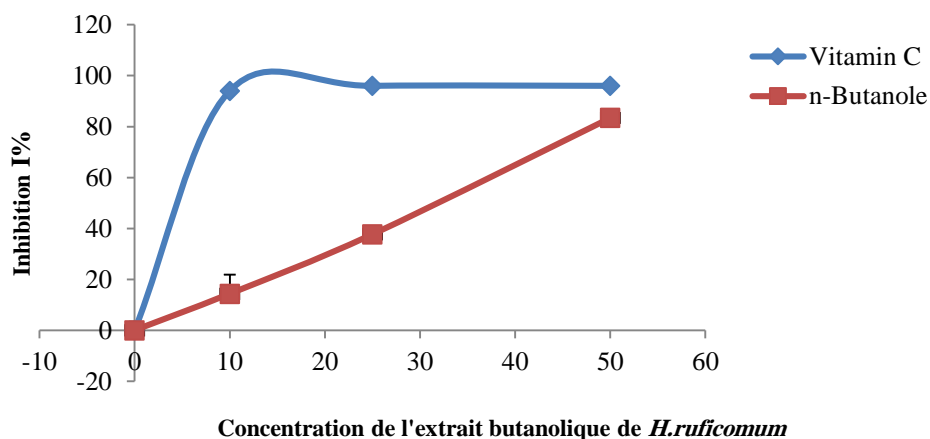


Figure 27 : l'activité anti radicalaire de radical DPPH \cdot de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* et de la vitamine C (moyenne de trois répétition).

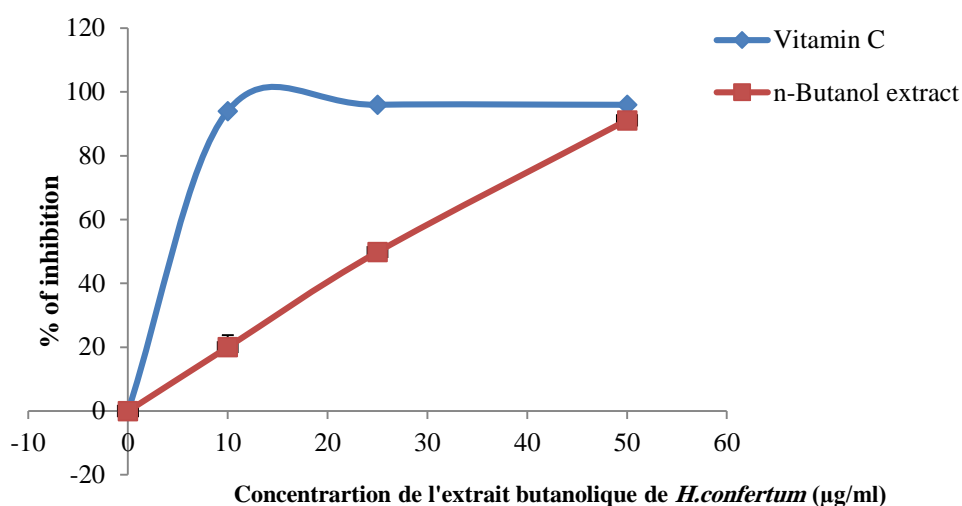


Figure 28 : l'activité anti radicalaire de radical DPPH' de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* et de la vitamine C (moyenne de trois répétition).

3. Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est parmi les paramètres les plus importants pour évaluer l'effet antioxydant des plantes. Les composants résultent d'après la peroxydation lipidique par les radicaux libres ont un effet néfaste contre les enzymes et les récepteurs membranaires, et parmi ces composants terminant, on cite l'MDA qui est le composant le plus effectuant (Gul *et al.*, 2013). L'évaluation des capacités des extraits d'inhiber la peroxydation lipidique (non enzymatique dans le jaune d'œuf est excitée par le FeSO_4) est illustrée dans les figures suivantes (Figure 29, 30, 31).

Une diminution dose-dépendante de la peroxydation lipidique a été observé avec les deux extraits butanolique *H. confertum* et *H. ruficomum* ($\text{IC}_{50} = 242,15 \pm 8,25 \mu\text{g/ml}$ et $300 \pm 5,62 \mu\text{g/ml}$, alors que l' IC_{50} de la vitamine C est de $20 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$). Ces résultats montrent que les extraits ont une capacité modérée d'inhiber la peroxydation lipidique.

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

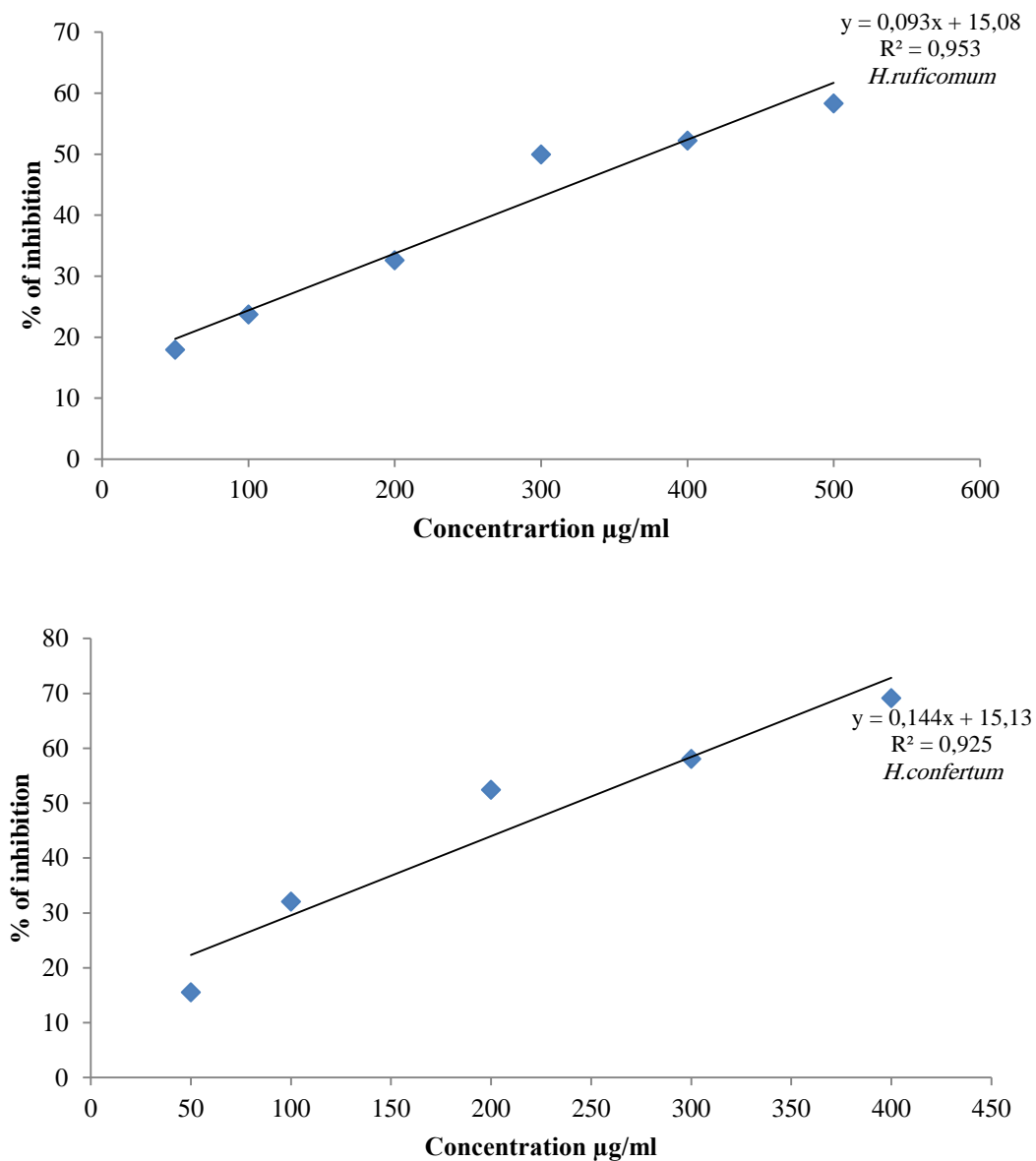


Figure 29 : Inhibition de la peroxydation lipidique (formation du MDA) par les deux extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* à différentes concentrations (IC50) (moyenne de trois répétition).

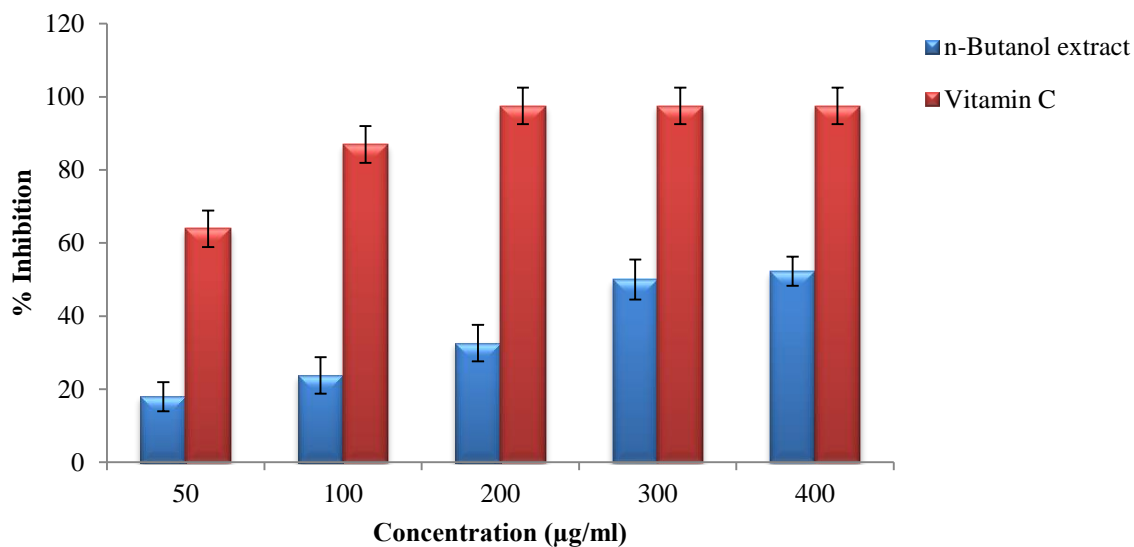


Figure 30 : l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* et de la vitamine C (moyenne de trois répétition).

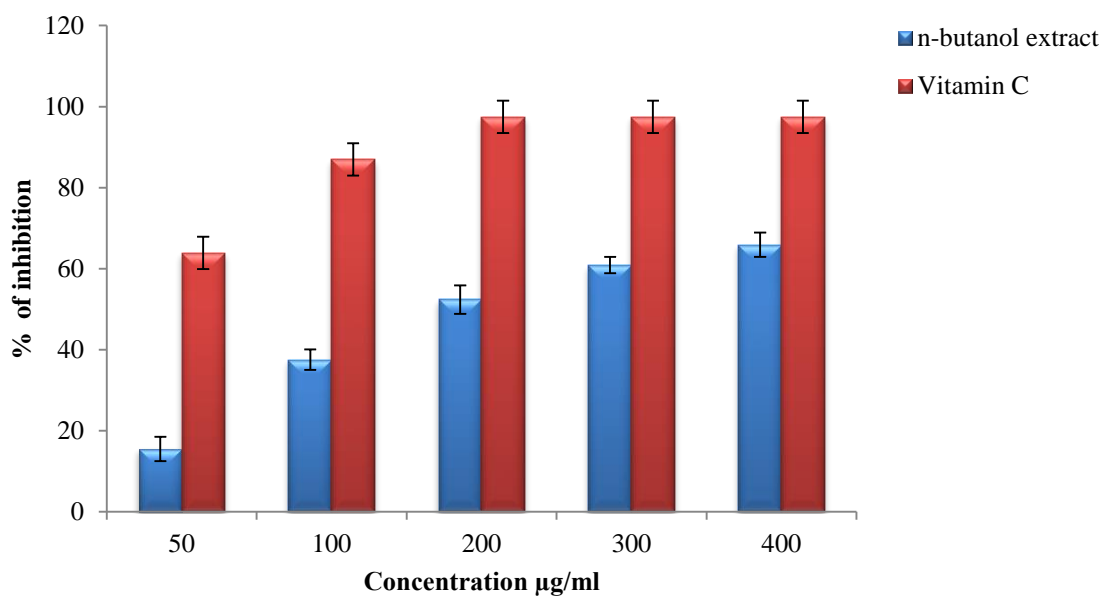


Figure 31 : l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* et de la vitamine C (moyenne de trois répétition).

4. L'effet des extraits des plantes sur des lignées cellulaires cancéreuses *in vitro*

L'activité anticancéreuse des deux extraits a été évaluée sur deux lignées cellulaires : HeLa (human cervix carcinoma) et HT29 (human colorectal adenocarcinoma). Les résultats obtenus montrent que les extraits possèdent une activité anticancéreuse très significative.

Le suivi de la prolifération des cellules HeLa et HT29 en présence et en absence des extraits par l'analyseur des cellules en temps réel xCELLigence (RTCA) durant les 51h montre que les extraits ont une activité antiproliférative dose-dépendante contre les cellules HeLa et HT29 le long de l'expérience, comparant au contrôle (prolifération des cellules HeLa et HT29 sans traitement) et au milieu de culture (niveau de prolifération est zéro). Les Figures (32 A, 32B et 33 A, 33 B) montrent des différents profils de différentes concentrations, on a remarqué que l'effet le plus intéressant correspond à la dose la plus élevée (250 µg/ml) par rapport au contrôle et au milieu de culture, tandis que les deux autres doses (50 et 100 µg/ml) présentent un effet anticancéreux significatif presque semblable à la dose 250µg/ml durant les 51 h. Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux qui découvrent que les plantes médicinales sont des agents anticancéreux puissants contre une variété des cellules malignes humaine y compris : la prostate, le colon, les reins, le pancréas et les glandes mammaires (Chung *et al.*, 2011). Cette effet bénéfique est due à la présence des quantités importantes des polyphénols qui sont des antioxydantes puissants (Yaghioglu, *et al.*, 2013).

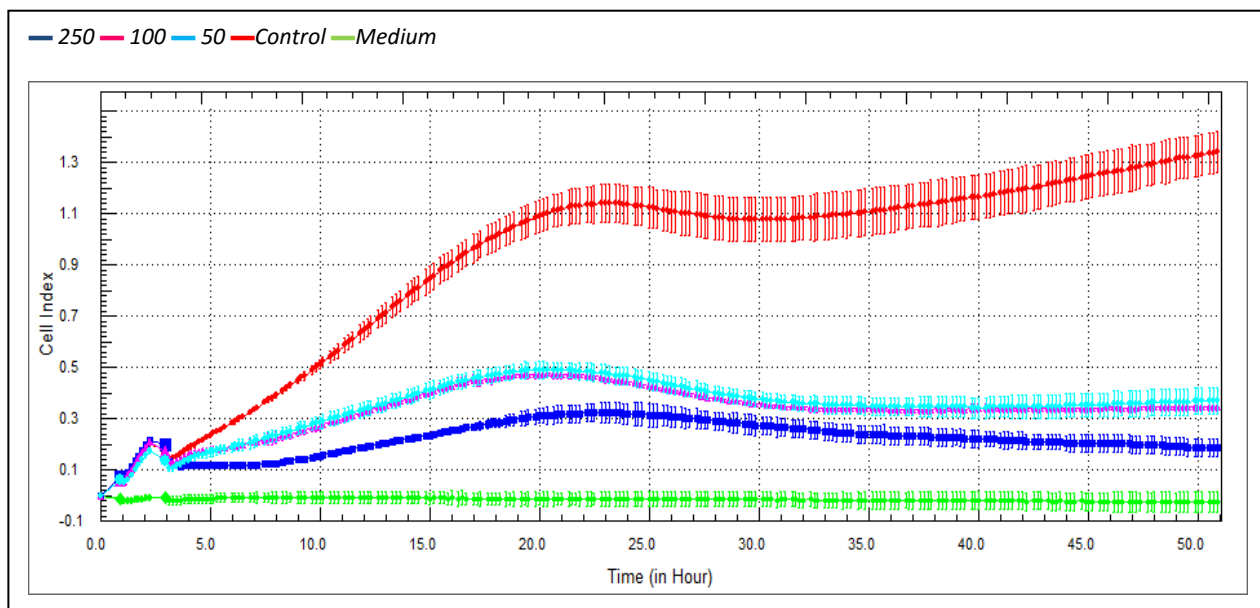


Figure 32 A: L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* sur la ligne cellulaire HT29 ($2,5 \times 10^4$ cell/well). Trois concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Chaque concentration a été testée en deux expériences et en trois répétitions ($n = 3$) en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

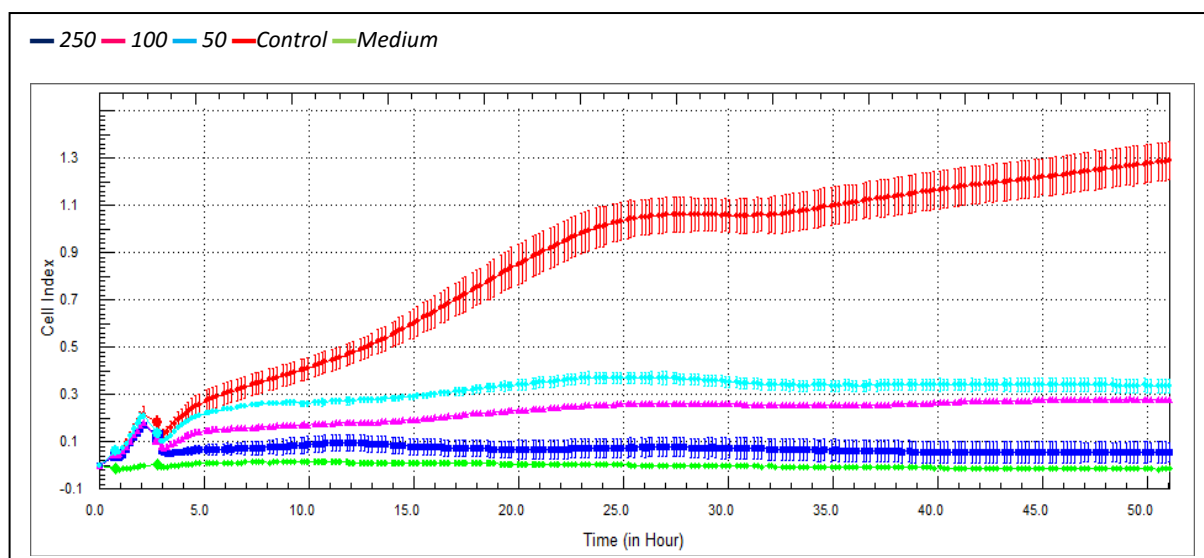


Figure 32 B: L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* sur la ligne cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cell/well). Trois concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Chaque concentration a été testée en deux expériences et en trois répétitions ($n = 3$) en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

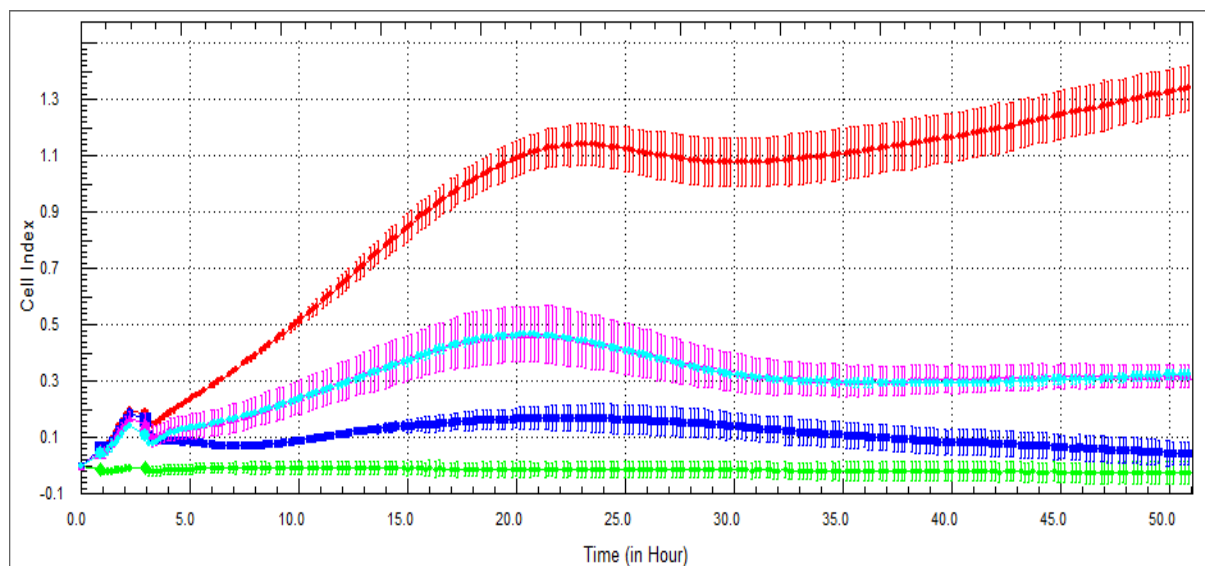


Figure 33 A : L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* sur la ligne cellulaire HT29 (2,5X10⁴ cell/well). Trois concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml). Chaque concentration a été testée en deux expériences et en trois répétitions ($n = 3$) en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

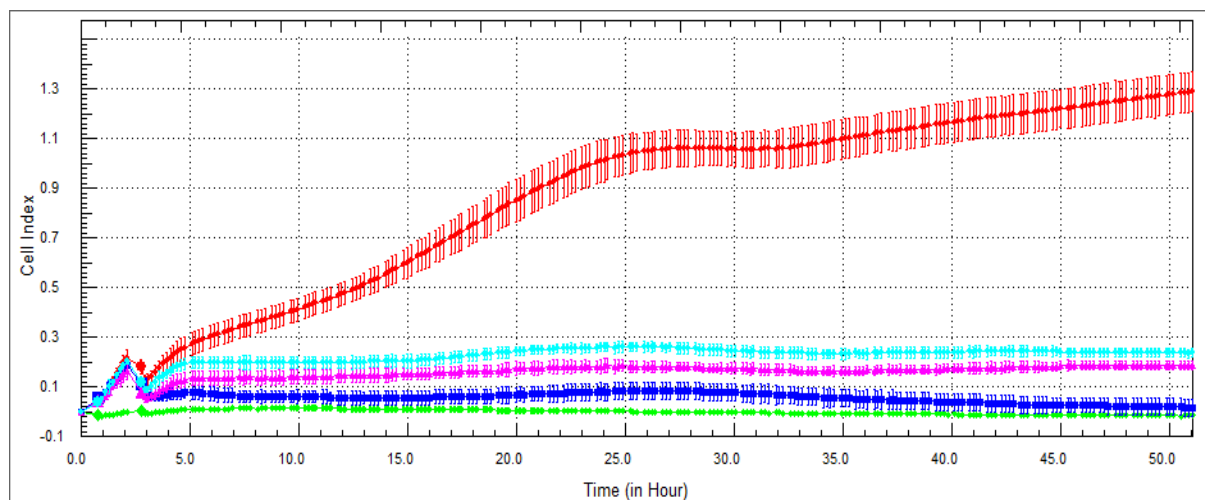


Figure 33 B : L'activité anti cancéreuse de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* sur la ligne cellulaire HeLa (2,5X10⁴ cell/well). Trois concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml). Chaque concentration a été testée en deux expériences et en trois répétitions ($n = 3$) en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

II.2. Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vivo*

2.1. L'Effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Helianthemum confertum* vis-vis la toxicité aiguë induite par la doxorubicine (10mg/kg)

2.1.1. L'effet des différents traitements sur les marqueurs biochimiques

2.1.1.1. Les enzymes transaminase AST et ALT

L'effet de la doxorubicine et l'extrait butanolique sur la fonction hépatique est illustré dans la (Figure 34). Les résultats obtenus montrent une élévation très hautement significative ($p < 0.001$) du niveau sérique d'AST chez les rats traités par la DOX en comparaison avec le groupe témoin non traité.

Par contre l'administration de l'extrait (50 et 100 mg/kg) temporelise l'effet de la doxorubicine comparant avec le groupe traité par la DOX ($p < 0.05$). Aussi bien, le groupe traité par la DOX (10mg/kg) indique une élévation non significative du niveau sérique d'ALT par rapport au groupe témoin non traité. Cependant et comparant avec le groupe traité par la DOX, le prétraitement par l'extrait butanolique (100mg/kg), on constate une diminution significative ($p < 0.05$) d'ALT. Ces résultats confirment que l'extrait butanolique de cette plante a un effet protecteur vis-à-vis la toxicité provoquée par la DOX.

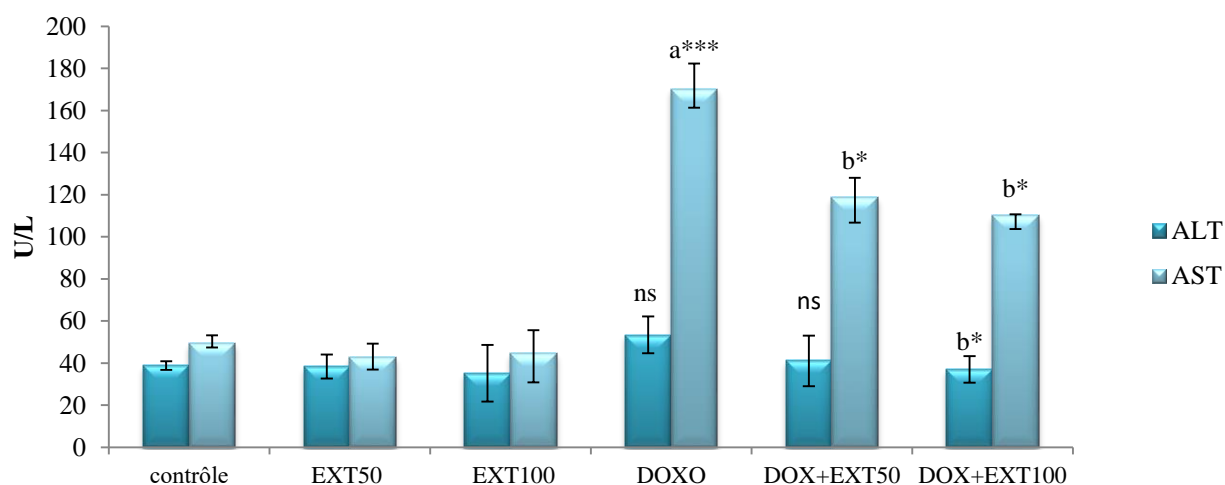


Figure 34 : Effet de la DOX (10mg/kg) et l'extrait *butanolique* de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur la concentration sérique des aminotransférase : AST et ALT. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$.

a : Groupe comparé au groupe contrôle.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.1.1.2. L'effet des différents traitements sur le taux du cholestérol et les triglycérides

Les résultats présentés dans la (Figure 35) montrent une augmentation significative du taux du cholestérol ($p < 0.01$) chez les rats traités par la DOX en comparant avec les rats du groupe témoin non traité. Par contre, chez les rats prétraités par l'extrait par les deux doses de l'extrait (50 et 100 mg/kg) provoque une diminution du taux de cholestérol. Cependant, on note que ce traitement tempore l'effet de la DOX et normalisent les valeurs du cholestérol ($p < 0.01$) ($p < 0.001$) respectivement.

Aussi bien, on remarque une augmentation non significative du taux des triglycérides chez les rats traités par la DOX. Par contre le prétraitement par l'extrait butanolique (100mg/kg) réduit ces valeurs significativement ($P < 0.05$), ce qui signifie que cet extrait a pu diminuer l'excès du cholestérol et des triglycérides dans le sang.

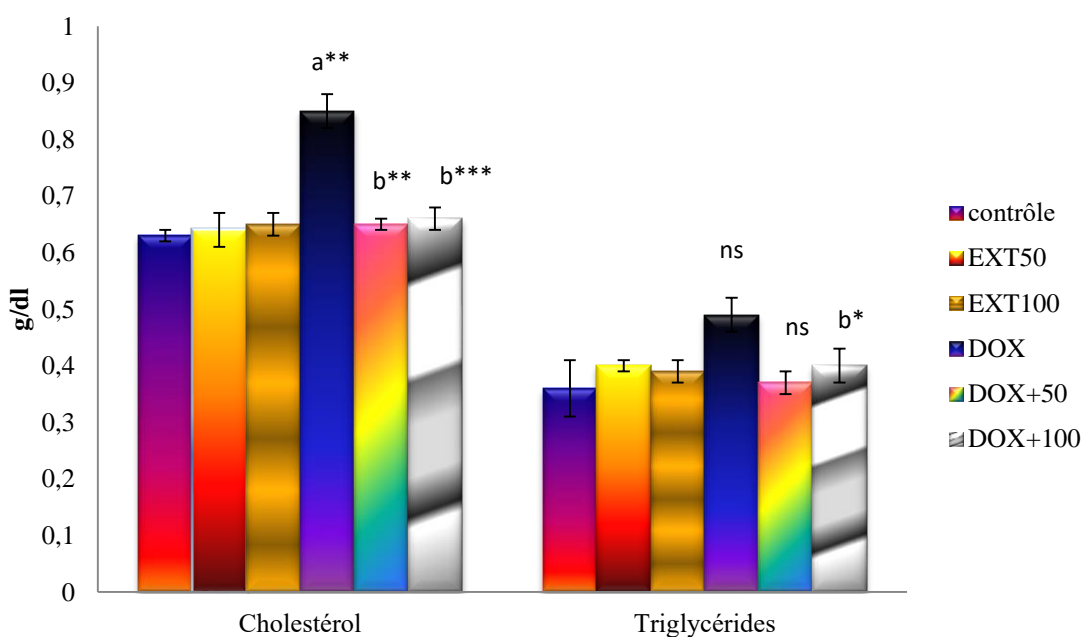


Figure 35 : Influence de l'administration de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) et la DOX (10mg/kg) et sur la concentration sérique du cholestérol et des triglycérides chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.1.2. L'effet des différents traitements sur le statut oxydant

2.1.2.1. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) dans le foie et les reins

Nous avons constaté une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) d'MDA chez les rats recevant la DOX comparant au groupe témoin non traité. Par ailleurs, une diminution significative ($p < 0.05$ et $p < 0.001$) du taux d'MDA est constatée dans le foie et les reins chez les rats recevant la DOX et traités par l'extrait avec les doses (50 et 100 mg/kg). Ce résultat explique que l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* a un effet protecteur. Le prétraitement par l'extrait diminue l'oxydation des lipides chez les rats et normalise la valeur d'MDA comparativement au groupe témoin (Figure 36).

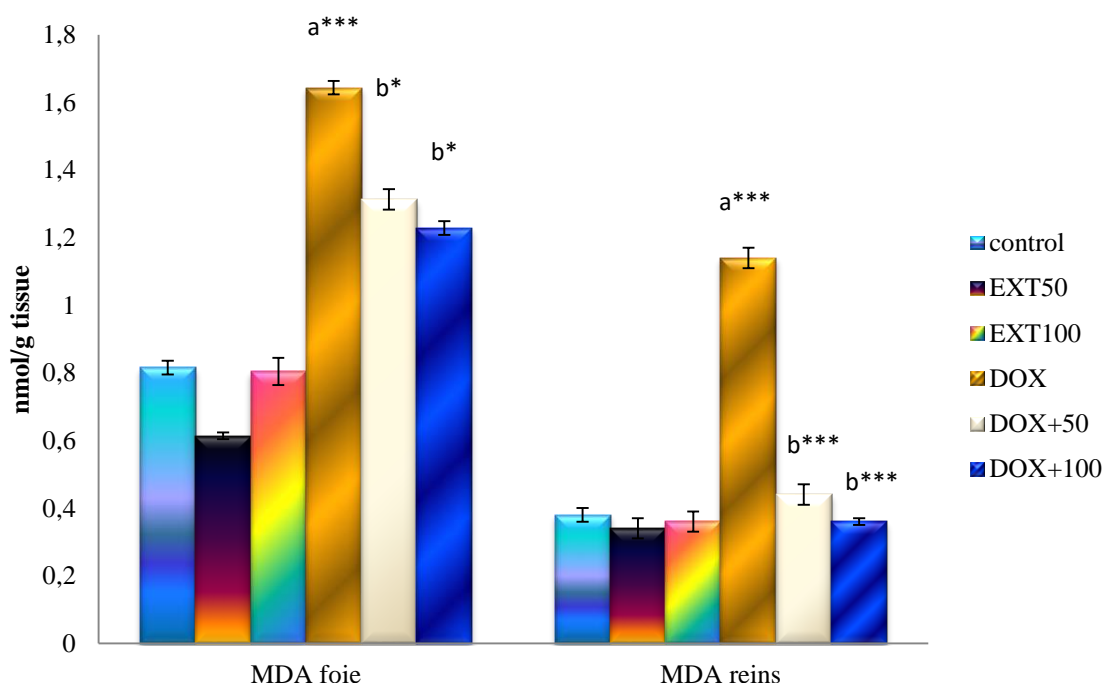


Figure 36 : Influence de l'administration de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) et de la DOX (10mg/kg) et sur le taux d'MDA du foie et du rein des différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)
 a : Groupe comparé au groupe témoin.
 b : Groupes comparés au groupe DOX.
 ns : non significative.

2.1.2.2. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) dans le cœur

Nous avons remarqué une élévation hautement significative ($p < 0.01$) du taux d'MDA chez les rats recevant la DOX comparant au groupe témoin non traité, mais rien n'est constaté chez le groupe prétraité par la dose (50mg/kg) de l'extrait.

Par ailleurs, nous avons constaté une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du taux d'MDA chez les rats recevant la DOX et prétraités par la dose (100 mg/kg) d'extrait. Ce résultat indique l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* a un effet protecteur via la diminution de l'oxydation des lipides chez les rats (Figure 37).

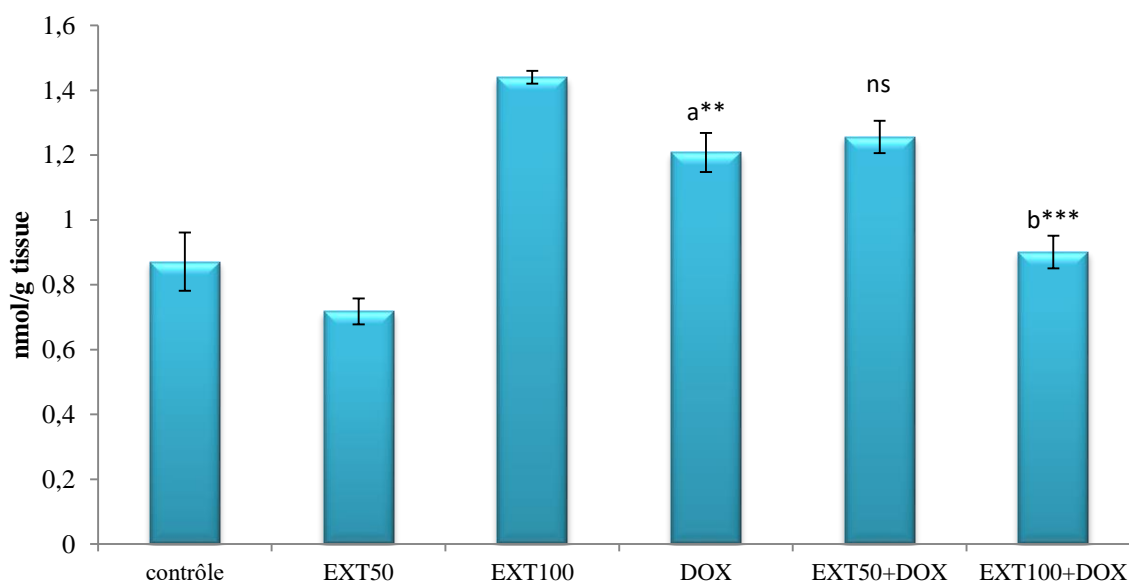


Figure 37 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur le taux d'MDA du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.1.3. L'effet des différents traitements sur le statut antioxydant

2.1.3.1. L'effet sur le glutathion réduit (GSH) du foie et des reins

Les résultats illustrés dans la Figure (38) montrent un effet remarquable de l'extrait butanolique (100mg/kg) sur le taux du glutathion réduit ou GSH. Nous avons enregistré une augmentation significative du taux de GSH au niveau du foie et des reins des rats traités par l'extrait (100 et 50mg/kg) respectivement comparant au groupe témoin non traité. Par contre nous avons remarqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de GSH au niveau du foie et des reins chez les rats traités par la DOX par rapport au groupe témoin non traité. Aussi bien, une augmentation non significative de GSH est constatée au niveau des reins des rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait butanolique (50 et 100 mg/kg) comparant à celui du groupe DOX.

D'autre part au niveau du foie, une variation significative ($p < 0.05$) du GSH est observée chez les rats recevant la DOX et prétraités par les deux doses de l'extrait butanolique avec (50 et 100 mg/kg).

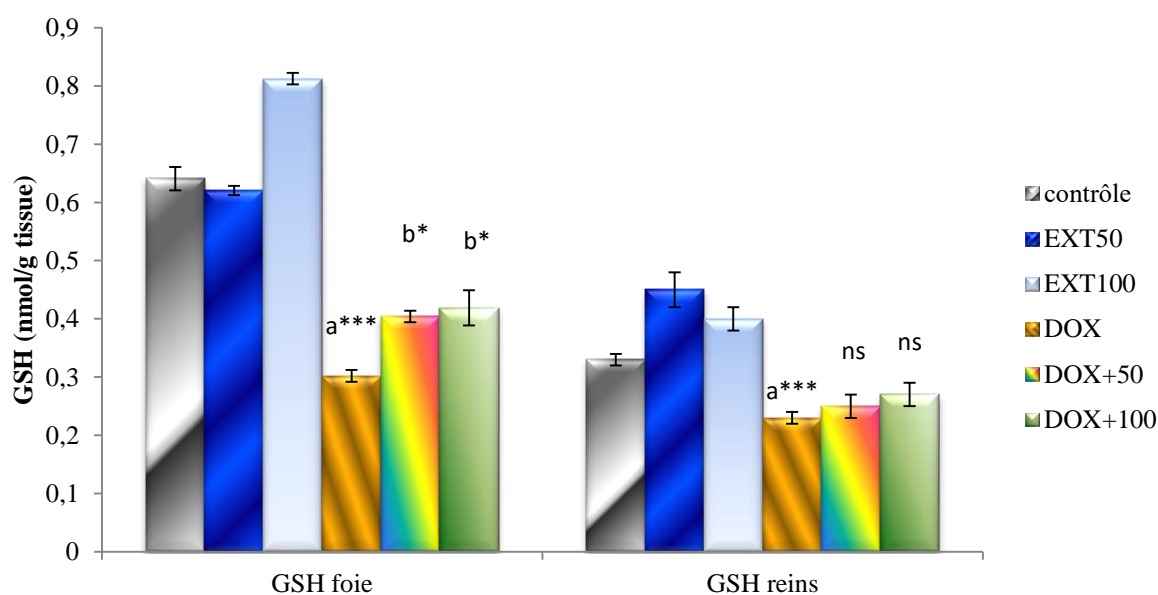


Figure 38 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50 et 100mg/kg) sur le niveau de GSH du foie et des reins chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, a : Groupe comparé au groupe témoin. b : Groupes comparés au groupe DOX. ns :non significative.

2.1.3.2. L'effet sur le taux de GSH du cœur

Au niveau du cœur on note une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de GSH chez les rats recevant la DOX par rapport au groupe témoin non traité. Par contre, on constate respectivement une augmentation significative ($p < 0.05$) et très hautement significative ($p < 0.001$) comparant au groupe DOX chez les rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait butanolique (50 et 100 mg/kg) (Figure 39).

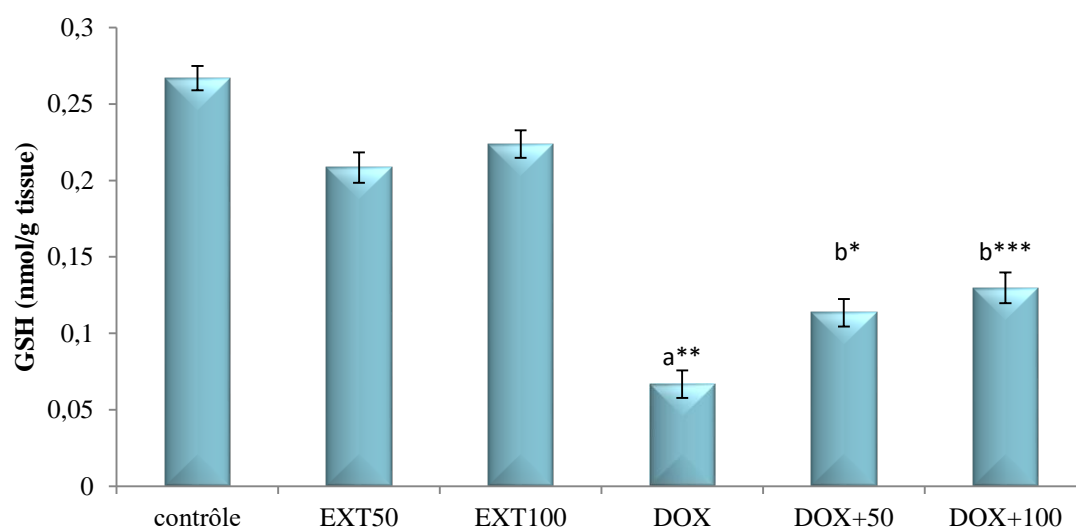


Figure 39 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur le taux de GSH du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,
a : Groupe comparé au groupe témoin.
b : Groupes comparés au groupe DOX.
ns : non significative.

2.1.3.3. L'Effet sur l'activité de la GPx du foie et des reins

Les résultats illustrés dans la Figure (40) montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique du GPx dans l'homogénat du foie et des reins chez les rats traités par la DOX comparant à celle mesurée chez les rats témoins non traité. L'activité enzymatique de ce système antioxydant est conservée à son niveau normal chez les rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait à la dose 100 mg/kg au niveau du foie et des reins par rapport au groupe DOX ($p < 0.001$). Par contre, on observe une augmentation significative ($p < 0.01$) de l'activité de cet enzyme chez les rats prétraités par l'extrait à la dose (50mg/kg) seulement au niveau du foie.

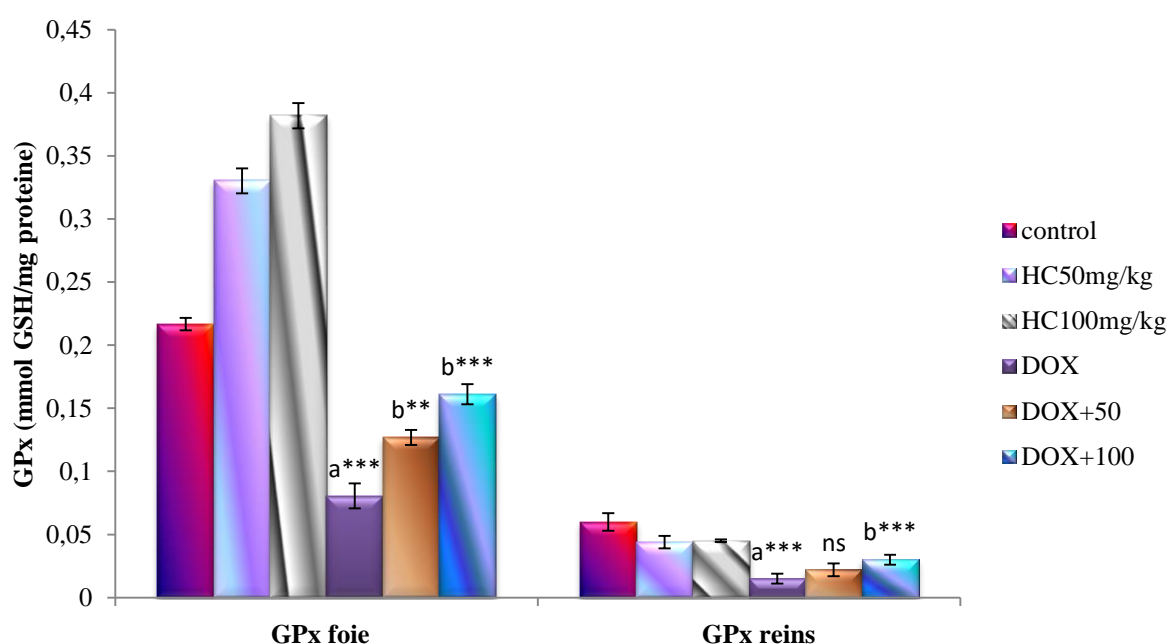


Figure 40 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur l'activité de GPx du foie et des reins chez les rats différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, a : Groupe comparé au groupe témoin. b : Groupes comparés au groupe DOX. ns : non significative.

2.1.3.4. L'effet sur l'activité de la GPx du cœur

Les résultats illustrés dans la Figure (41) montrent que le traitement des rats avec une seule dose de la DOX (10mg/kg) provoque une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité de l'enzyme GPx dans l'homogénat du cœur en comparaisons à celle mesurée chez les animaux non traités ou témoins. Cependant, on observe une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) chez les rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait (50, 100mg/kg).

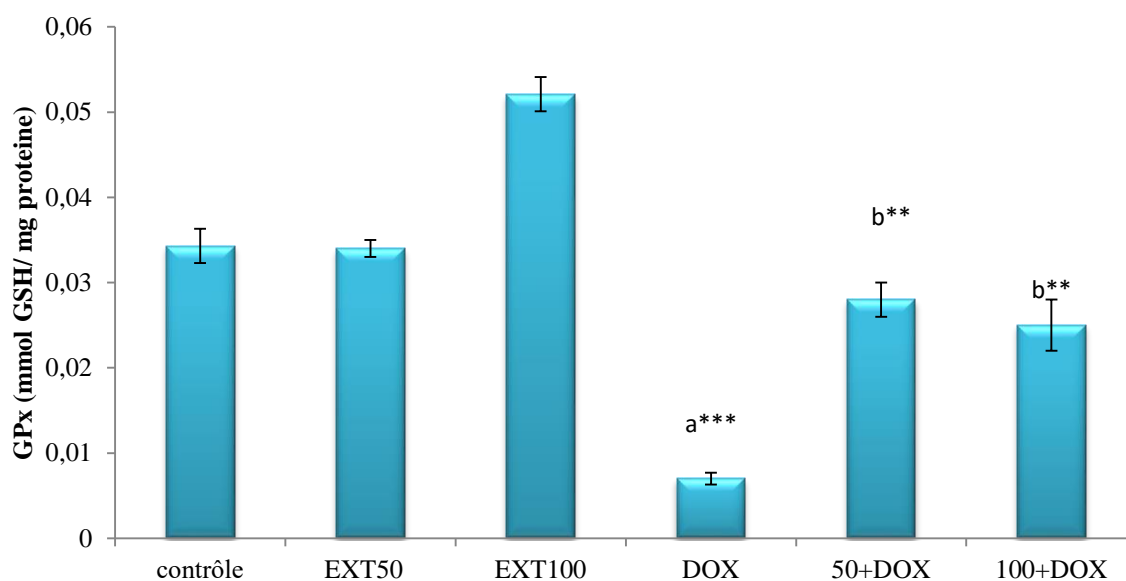


Figure 41 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur l'activité de GPx du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.1.3.5. L'effet sur l'activité de catalase du foie et des reins

Les résultats obtenus (Figure 42) révèlent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité de la CAT dans l'homogénat du foie et des reins chez les rats traités par la DOX comparant à celle mesurée chez les rats témoins ou non traités. Par contre on note une augmentation significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) chez les rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait butanolique (50 et 100 mg/kg) respectivement au niveau du foie et des reins en comparant avec le groupe DOX. Alors, on note que le prétraitement par les deux doses de l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* a diminué l'effet toxique de la DOX.

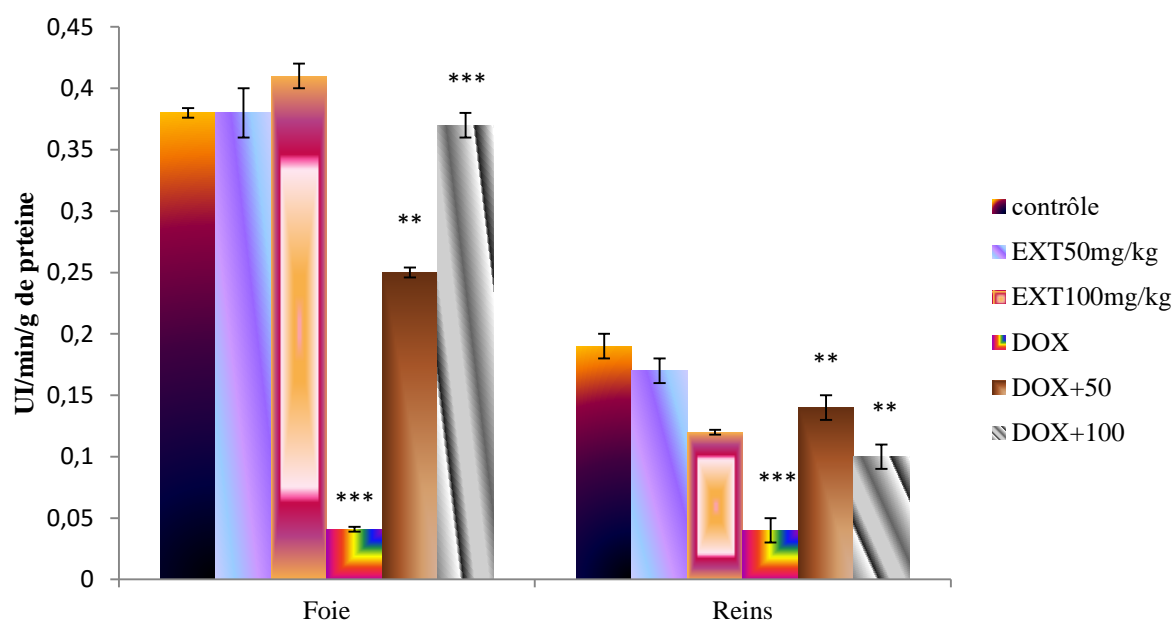


Figure 42 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur l'activité de catalase du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont en des moyenne \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, a : Groupe comparé au groupe témoin. b : Groupes comparés au groupe DOX. ns : non significative.

2.1.3.6. L'effet des différents traitements sur l'activité de la catalase du cœur

Nous avons constaté une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité du CAT dans l'homogénat du cœur chez les rats traités par la DOX à la dose (10mg/kg) par rapport au groupe témoin non traités. Par contre et en comparant avec le groupe DOX, on révèle une élévation significative ($p < 0.01$ et $p < 0.05$) chez les rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50 et 100mg/kg) respectivement (Figure 43).

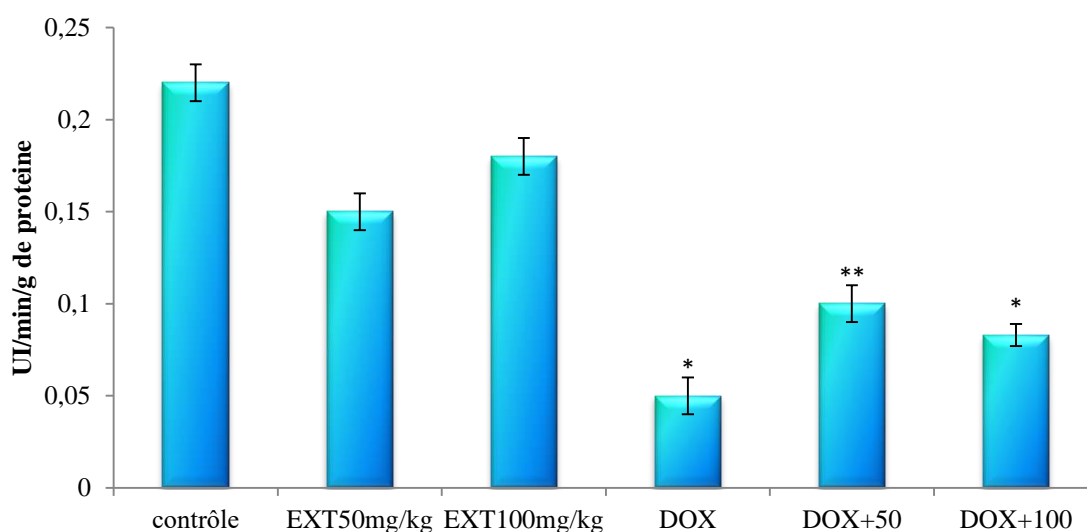


Figure 43 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg) et l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* (50, 100mg/kg) sur l'activité de catalase du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, a : Groupe comparé au groupe témoin. b : Groupes comparés au groupe DOX. ns : non significative.

2.1.4. Etude histologique

2.1.4.1. Au niveau du foie

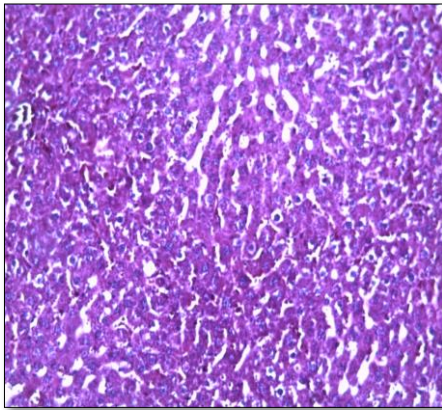
Les coupes histologiques du foie des rats de groupe témoin non traité apparaissent sans modification ou la forme structurelle normale du foie. C'est-à-dire, l'architecture du parenchyme hépatique est conservée, hépatocytes de cytologie normale se disposant de façon radiale aux alentours de la veine centrolobulaire, par ailleurs les résultats obtenus du groupe traité par la DOX (10mg/kg) présentent un changement morphologique au niveau du foie. On note : une conservation de l'architecture et de la cytologie, cependant une présence focale d'hépatocytes

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

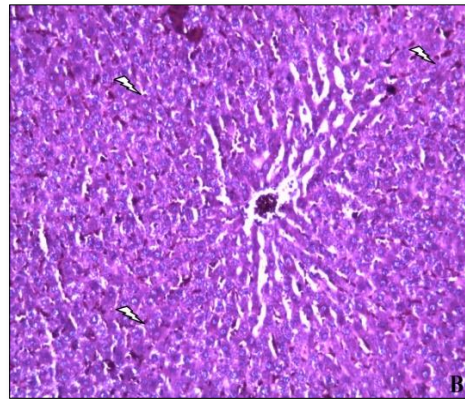
clarifiées en début de nécrose (70%) et une petite dilatation des capillaires sinusoidaux (Figure 43).

Le traitement par l'extrait butanolique a diminué les changements morphologiques provoqués par la DOX et surtout à la dose (50mg/kg). Où on observe une petite dilatation des capillaires sinusoidaux, une conservation de l'architecture et de la cytologie, cependant une présence focale d'hépatocytes clarifiées en début de nécrose (30%). Par contre chez les rats prétraités par l'extrait de la plante *H. confertum* à la dose (100mg/kg), on observe une petite dilatation des capillaires sinusoidaux, une conservation de l'architecture et de la cytologie, cependant une présence focale d'hépatocytes clarifiées en début de nécrose (50%). Ces observations sont illustrées dans la (Figure 44) en dessous :

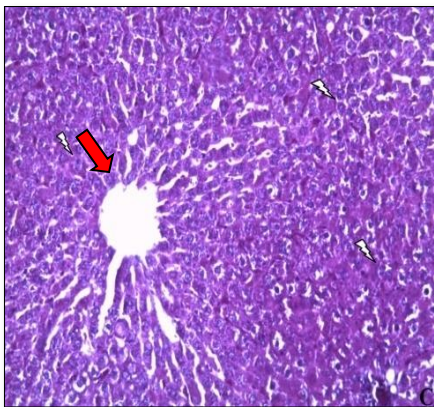
Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo



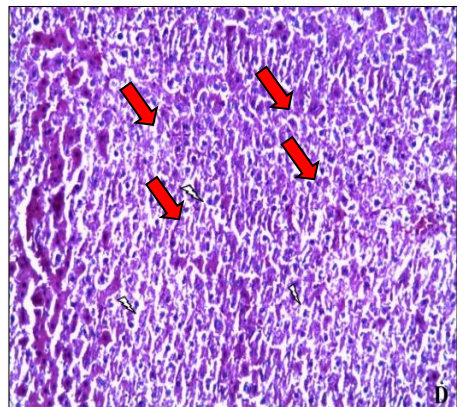
A : Foie d'un rat témoin
(X100).



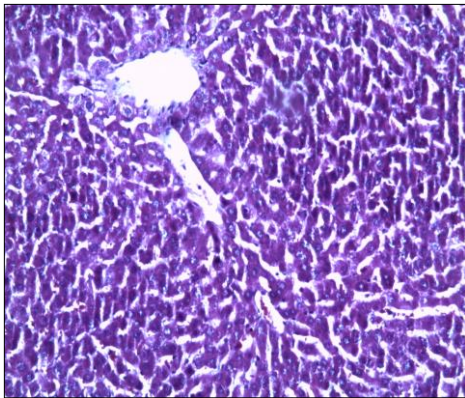
B : Foie d'un rat traité par l'extrait
butanolique (*H. confertum*) (50
mg/kg) (X 100).



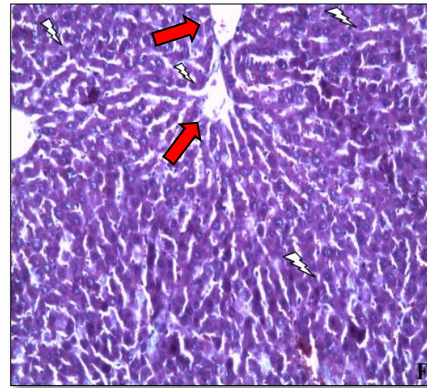
C : Foie d'un rat traité par l'extrait
butanolique (*H. confertum*) (100mg/kg).
Dilatation et congestion vasculaire. (× 100)



D : Foie du rat traité par la doxorubicine
(10mg/kg). Dilatation sinusoidale et nécroses
des hépatocytes (× 100).



E : Foie du rat prétraité par l'extrait butanolique (*H. confertum*) (50mg/kg) et doxorubicine. ($\times 100$).



F : Foie du rat prétraité par l'extrait butanolique (*H. confertum*) (100mg/kg) et doxorubicine. Dilatation et congestion vasculaire ($\times 100$).

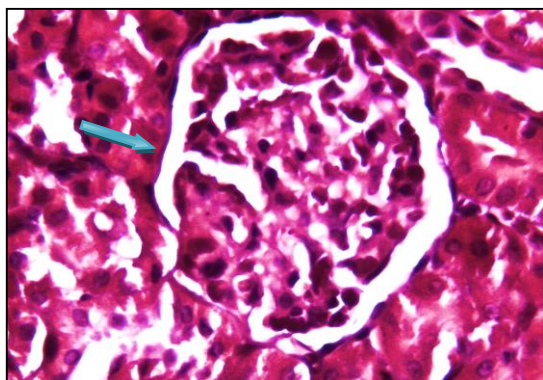
Figure 44 : Observation microscopique des coupes histologiques du foie des rats (x100).

2.1.4.2. Au niveau du rein

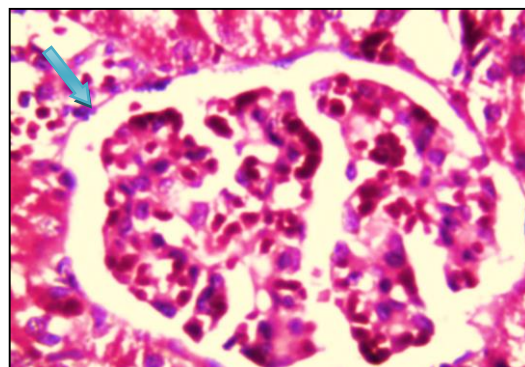
La Figure (45) illustre les observations microscopiques des coupes histologiques du rein des rats des différents groupes. L'image (45) montre qu'il n'y avait pas des changements morphologiques dans les reins du groupe témoin et les groupes traités par les deux doses de l'extrait (50 et 100 mg/kg) dans l'examen microscopique. Alors qu'il y avait des lésions rénales et des cellules tubulaires en début de nécrose (une liquéfaction tubulaire) dans les reins du groupe DOX.

En comparant avec le groupe traité par la DOX, l'examen microscopique des coupes histologiques du rein des rats prétraités par les deux doses (50 et 100 mg/kg) de l'extrait butanolique a montré des tubules et des glomérules presque normaux.

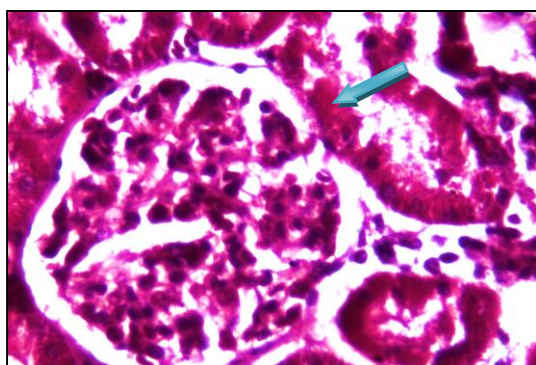
Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo



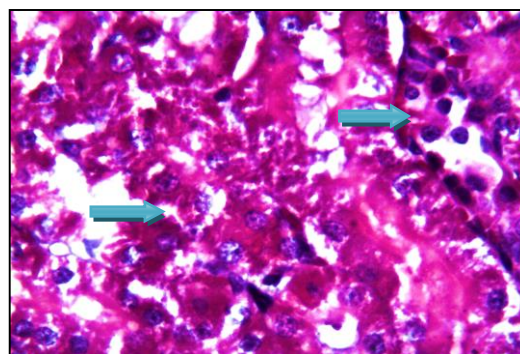
A : Rein d'un rat du groupe témoin.
Glomérule normal G (x400).



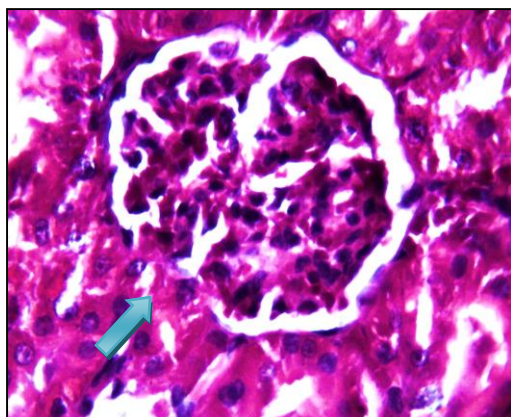
B : Rein d'un rat traité par l'extrait butanolique
(*H. confertum*) 100mg/kg (structure conservé)
G(x400).



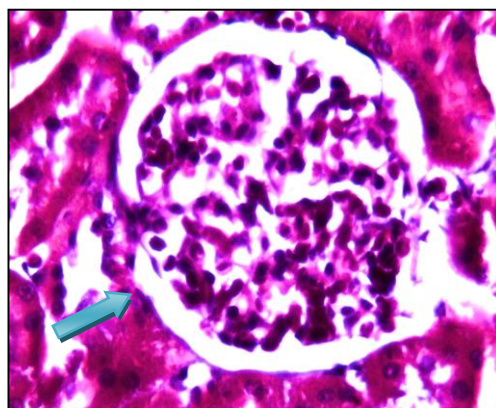
C : Rein d'un rat traité par l'extrait butanolique
(*H. confertum*) 50mg/kg (glomérule sein)
G(x400)



D : Rein d'un rat traité par la DOX
(10mg/kg). Début de nécrose au niveau des
tubes rénaux et une liquéfaction. G(x400).



E : Rein d'un rat traité par l'extrait butanolique (*H. confertum*) (50mg/kg) et la DOX. Glomérule sein. G(x400).



F : Rein d'un rat traité par l'extrait butanolique (*H. confertum*) (100mg/kg) et la DOX. Glomérule sein. G(x400)

Figure 45 : Observation microscopique des coupes histologiques du rein des rats (x400).

2.2. L'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Helianthemum ruficomum* (50 et 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) vis-à-vis de la toxicité aigüe induite par la doxorubicine (15mg/kg)

2.2.1. L'effet des différents traitements sur les marqueurs biochimiques

2.1.1.1. Les enzymes transaminases (AST et ALT)

Le niveau des enzymes sériques (AST et ALT) a été estimé pour vérifier l'étendue de la toxicité du DOX au niveau du tissu hépatique. Les dommages ont révélé que le taux d'AST et d'ALT était significativement plus élevé ($P < 0,001$) dans le groupe traité avec la DOX par rapport aux animaux témoins non traité en indiquant un dysfonctionnement du foie (Figure 46). Alors que chez les rats traités par la DOX et les deux doses de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50 et 100mg/kg) on constate une diminution hautement significative ($P < 0,001$ et $P < 0,05$) respectivement du taux d'AST comparant au groupe DOX. Aussi bien on note une diminution très significative ($P < 0,01$) chez le groupe prétraité par la vitamine E en comparant avec le groupe DOX. Cependant et en comparant au groupe DOX, nous avons constaté une diminution très significative ($p < 0.01$) du taux d'ALT chez les groupes prétraités par les deux doses de l'extrait butanolique (50 et 100 mg/kg). Ainsi, chez le groupe prétraité avec la vitamine E (100mg/kg), on constate une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) par rapport au groupe DOX.

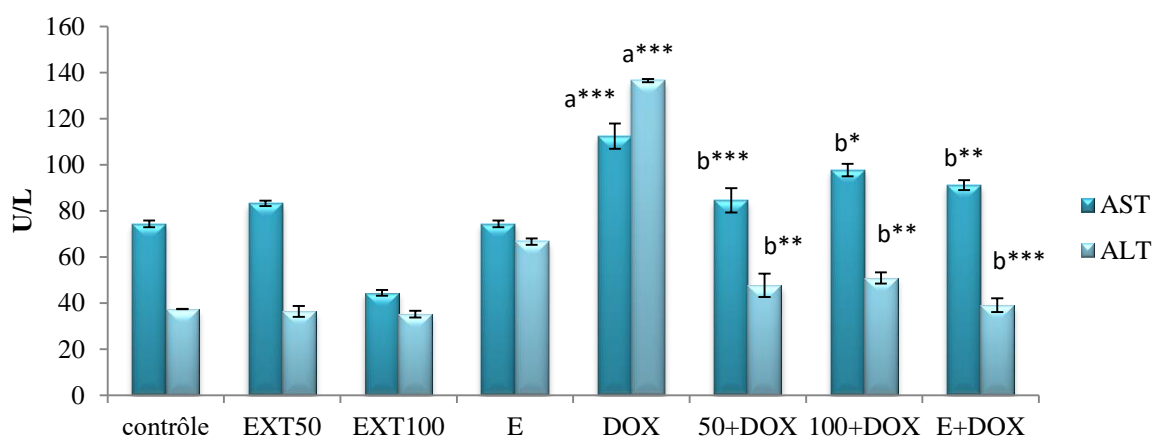


Figure 46 : Effet de la DOX (15mg/kg), l'extraits butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur la concentration sérique des aminotransférase : AST et ALT. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, a : Groupe comparé au groupe témoin. b : Groupes comparés au groupe DOX. ns : non significative.

2.2.1.2. L'effet sur le cholestérol

Les variations du taux de cholestérol sont représentées dans la (Figure 47). On remarque chez le groupe DOX, une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) par rapport au groupe témoin non traité. Cependant les groupes prétraités par l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50 et 100mg/kg) ont montré une diminution significative ($P < 0.05$) et une atténuation très hautement significative ($P < 0.001$) respectivement. En outre aucun changement significatif n'est observé dans le groupe prétraité avec la vitamine E (100 mg/kg).

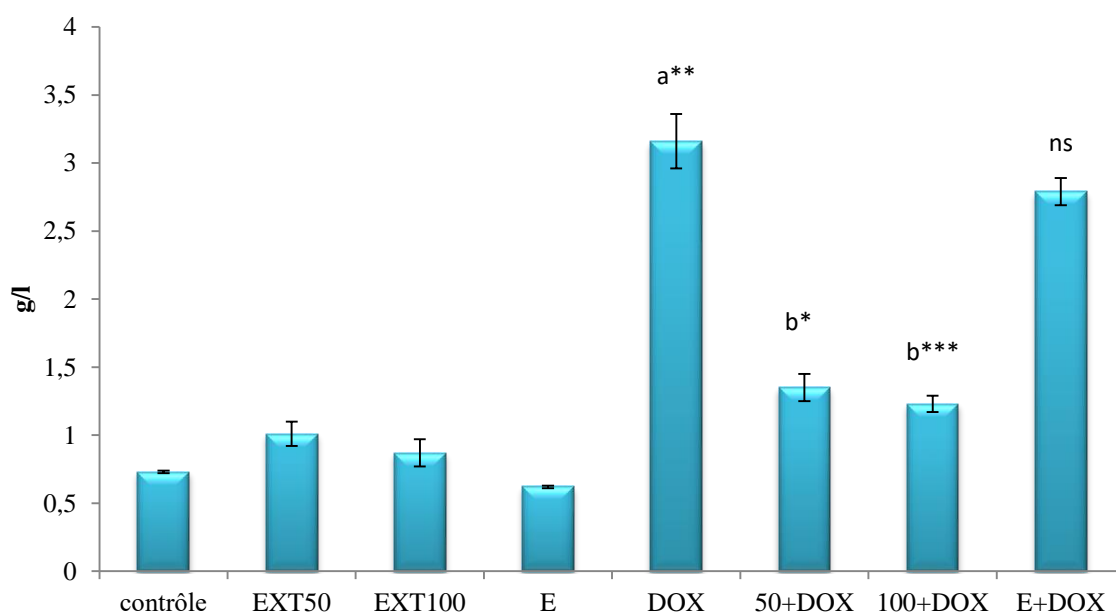


Figure 47 : Influence de l'administration de la doxorubicine (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur la concentration sérique du cholestérol chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$

** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.2.1.3. L'effet sur la concentration sérique de l'urée et la créatinine

Les concentrations de la créatinine sérique chez les rats traités par la doxorubicine (15 mg/kg) seule ou combiné avec l'extrait butanolique ou avec la vitamine E sont présentées selon la (Figure 48). Chez les rats traités seulement avec la doxorubicine, on a observé une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) de la créatinine plasmatique par rapport au groupe témoin. Cependant, la combinaison de doxorubicine avec l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50mg/kg) ou avec la vitamine E (100mg/kg) ont une atténuation significative ($P < 0,05$) de la créatinine sérique, par contre une diminution non significative a été remarqué à la dose (100 mg/kg) de l'extrait butanolique.

Aussi bien les rats traités avec la doxorubicine ont montré une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) de la concentration sérique d'urée par rapport aux témoins non traité (Figure 48). Cependant, chez les rats traités par les deux doses de l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum*, ou qu'avec la vitamine E (100 mg/kg), on observe une diminution significative ($P < 0,01$) du taux sérique d'urée.

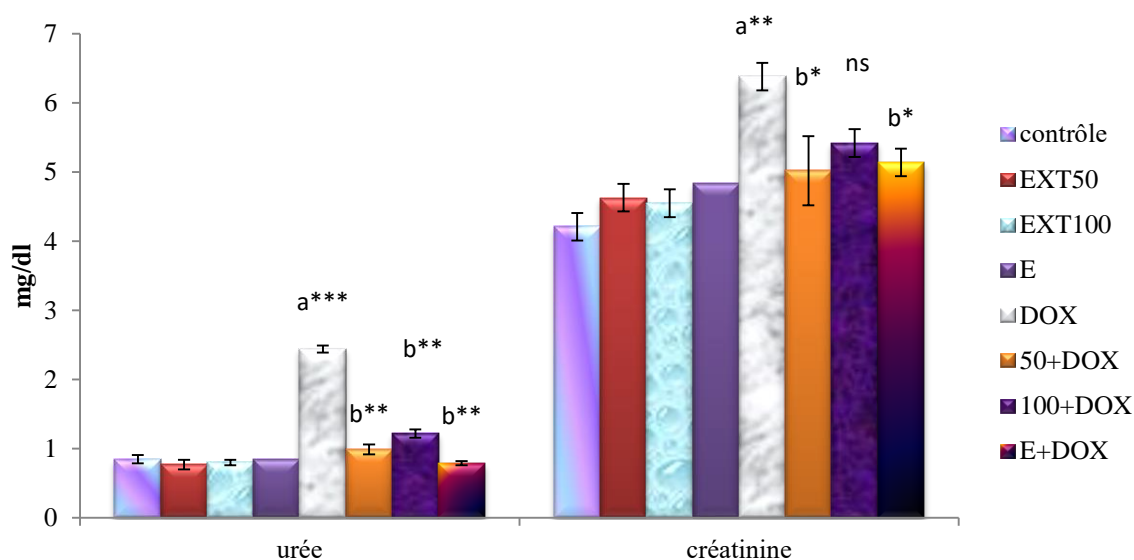


Figure 48 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur la concentration sérique de l'urée et de la créatinine chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, a : Groupe comparé au groupe témoin. b : Groupes comparés au groupe DOX. ns : non significative.

2.2.1.4. L'effet sur l'activité enzymatique du LDH dans le plasma

Les résultats obtenus montrent une élévation très hautement significative ($P < 0,001$) au niveau de l'enzyme LDH chez les rats traités par la DOX (15mg/kg) comparant au groupe témoin non traités. Cet enzyme LDH est considérée comme un marqueur biologique sélective des lésions du myocarde. Par contre un prétraitement avec l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50 et 100 mg/kg), ou avec la vitamine E (100mg/kg) on observe une diminution significative ($P < 0,01$) des taux élevés de cette enzyme (Figure 49).

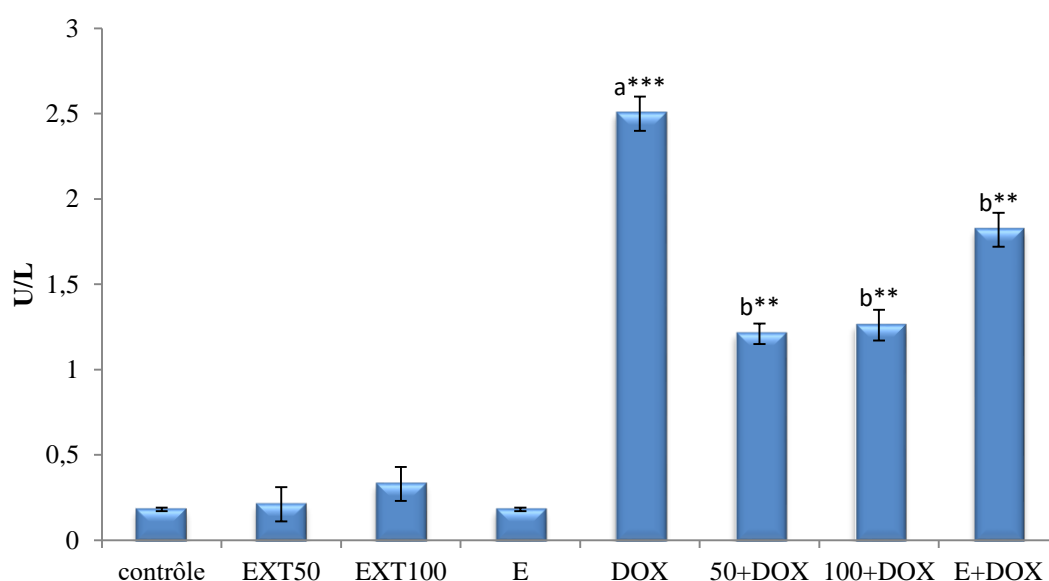


Figure 49 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur l'activité de l'enzyme LDH dans le plasma chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.3. L'effet des différents traitements sur le statut oxydant.

2.3.1. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) du foie et des reins

Une seule injection de la DOX (15mg/kg) a provoqué une augmentation significative de la peroxydation des lipides ($P < 0,01$ et $P < 0,001$) respectivement au niveau du foie et des reins par rapport au groupe témoin non traités (Figure 50). Cependant et en comparant au groupe DOX, un prétraitement avec l'extrait butanolique (100 mg/kg), ou la même dose de la vitamine E, a entraîné une réduction significative ou très significative au niveau d'MDA au niveau du foie ($P < 0,05$ et $P < 0,01$) respectivement. Alors que, le prétraitement avec la dose (50mg/kg) d'extrait butanolique a provoqué une réduction non significative au niveau du foie.

Aussi bien et au niveau des reins, une réduction significative, très et hautement significative ($P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$) a été observé chez les groupes prétraités avec l'extrait butanolique (50 et 100mg/kg), ou la vitamine E (100mg/kg) respectivement comparant au groupe DOX.

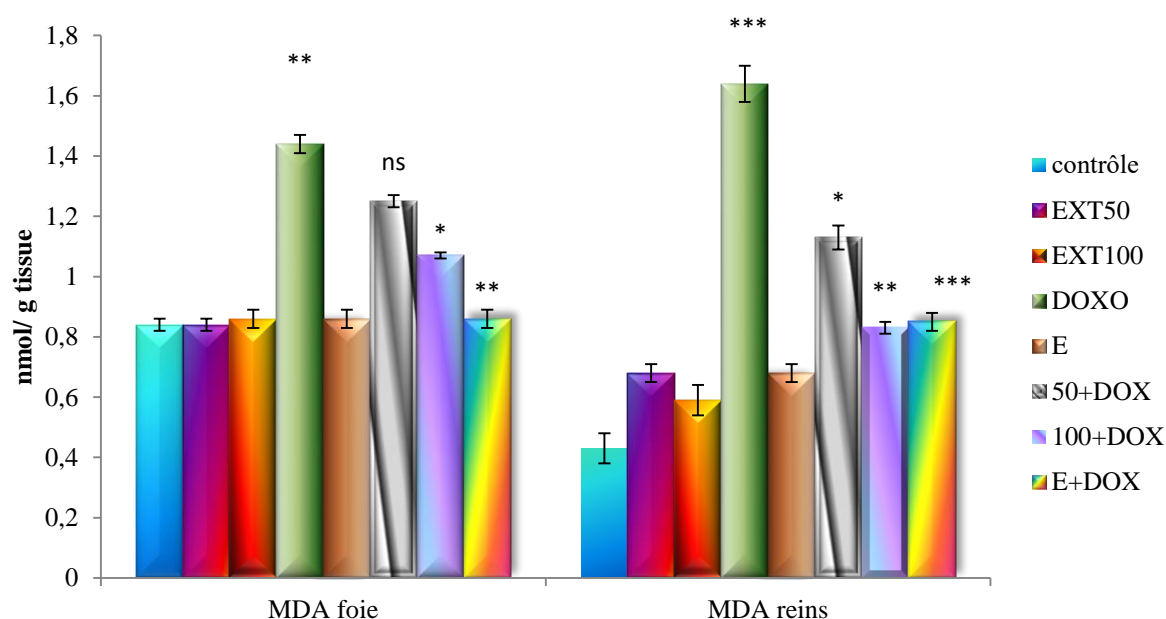


Figure 50 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur le taux d'MDA du foie et des reins chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,
a : Groupe comparé au groupe témoin.
b : Groupes comparés au groupe DOX.
ns : non significative.

2.3.2. L'effet sur la peroxydation lipidique (taux d'MDA) du cœur

La (Figure 51) indique l'effet des différents traitements sur le taux d'MDA au niveau du cœur. On observe chez les rats traités avec la doxorubicine (15mg/kg) une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) de taux d'MDA par rapport à la normale. Alors qu'une diminution très hautement significative ($P < 0.001$) a été enregistré chez les rats des groupes prétraités avec l'extrait butanolique (50 et 100mg/kg), ou la vitamine E (100mg/kg) par rapport au groupe DOX.

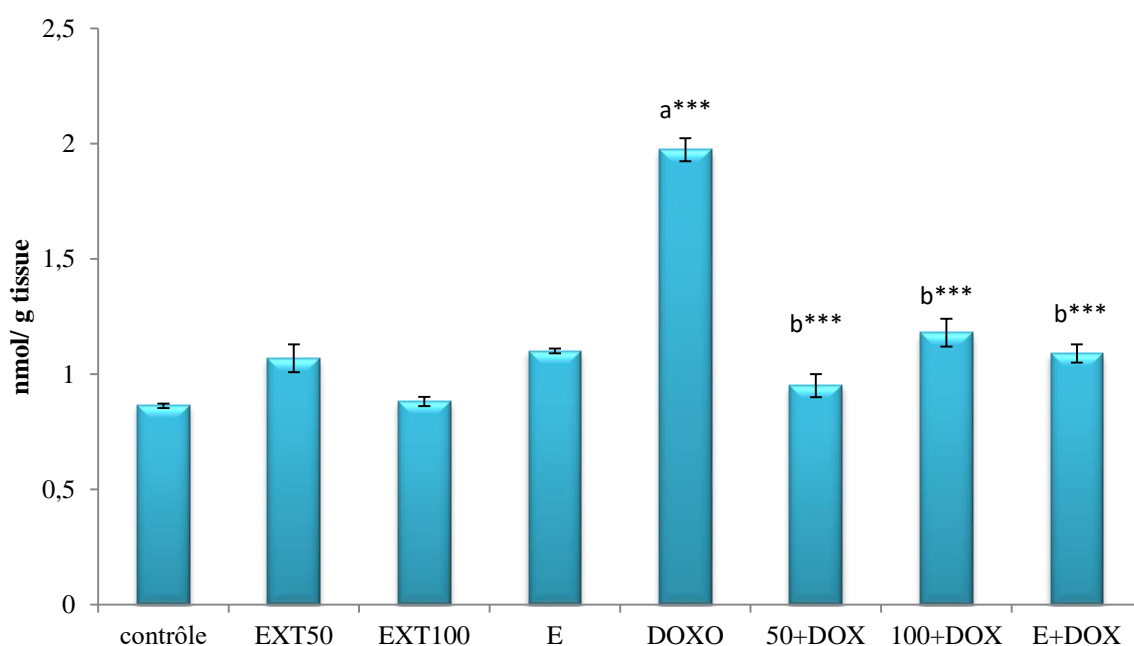


Figure 51 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur le taux d'MDA du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.4. L'effet des différents traitements sur le statut antioxydant

2.4.1. L'effet sur le GSH du foie et des reins

La (Figure 52) au niveau du foie et des reins, une réduction très hautement significative ($P < 0.001$) du taux de GSH a été enregistré chez les rats traités avec la DOX (15mg/kg) comparant au groupe témoin non traité. Par contre au niveau du foie, une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) de taux de GSH chez les rats des groupes prétraités avec les deux doses de l'extrait butanolique (50 et 100mg/kg), ou la vitamine E (100mg/kg) par rapport au groupe DOX. Alors qu'au niveau des reins, une élévation très hautement significative ($P < 0.001$) du taux de GSH a été observé chez les rats du groupe prétraité avec l'extrait butanolique (100mg/kg), comparant au groupe DOX. Mais aucune augmentation significative du taux de GSH n'a été constatée chez les rats prétraités avec l'extrait butanolique (50mg/kg), ou avec la vitamine E (100mg/kg) par rapport au groupe DOX.

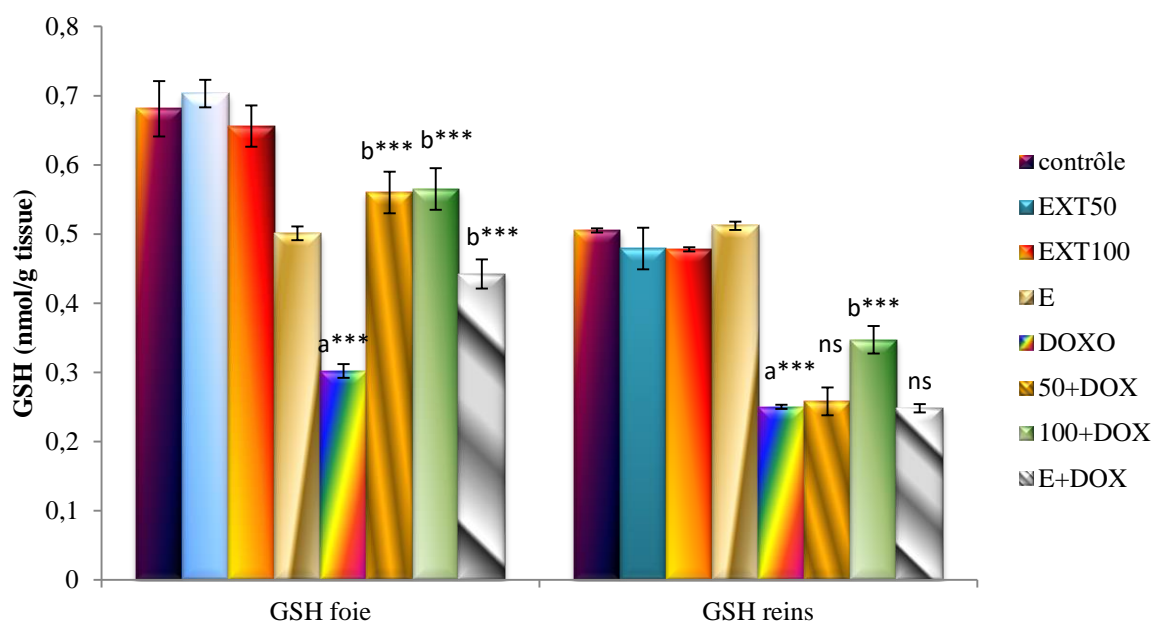


Figure 52 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur le niveau de GSH du foie et des reins chez les différents groupes. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.4.2. L'effet sur le GSH du cœur

D'après les résultats illustrés dans la (Figure 53), une diminution très hautement significative ($P < 0.001$) du taux de GSH du cœur a été constaté chez le groupe traité par la DOX comparant au groupe témoin non traité. Alors que le prétraitement avec l'extrait butanolique (100mg/kg), ou la vitamine E (100 mg/kg) augmente significativement ($P < 0.01$) le taux de ce paramètre au niveau du cœur par rapport au groupe DOX. Une augmentation non significative du taux de GSH au niveau du cœur de groupe prétraité avec l'extrait butanolique à la dose (50mg/kg) par rapport au groupe DOX.

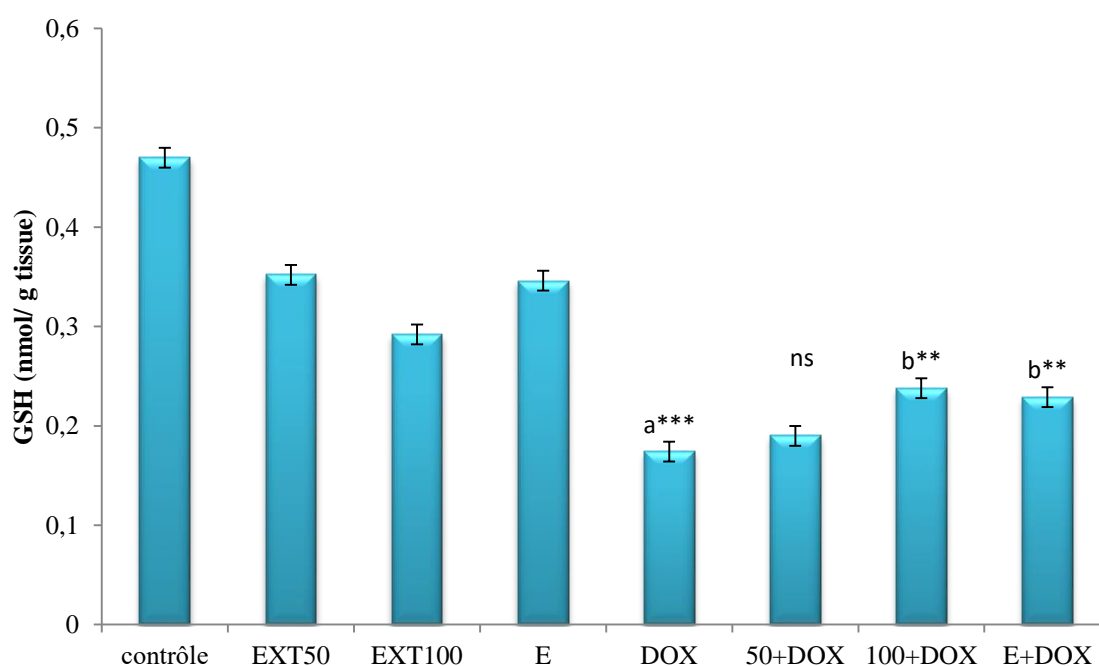


Figure 53 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur le taux de GSH du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.4.3. L'effet sur l'activité de la GPx du foie et des reins

Le traitement des rats avec la DOX (15mg/kg) a montré une diminution très hautement significative au niveau du foie ($P < 0.001$) et très significative ($P < 0.01$) au niveau des reins par rapport aux rats non traités. Par contre, le prétraitement avec l'extrait (50mg/kg), a montré une élévation très hautement significative ($P < 0.001$) au niveau du foie et significative ($P < 0.05$) au niveau des reins comparant au groupe DOX. Cependant le prétraitement avec l'extrait (100 mg/kg) a montré une élévation très hautement significative ($P < 0.001$) de l'activité de cette enzyme seulement au niveau du foie. Aussi bien, une augmentation significative ($P < 0.05$) au niveau des deux organes comparant au groupe DOX a été observé chez les rats du groupe prétraité avec la vitamine E (100mg/kg) (Figure 54).

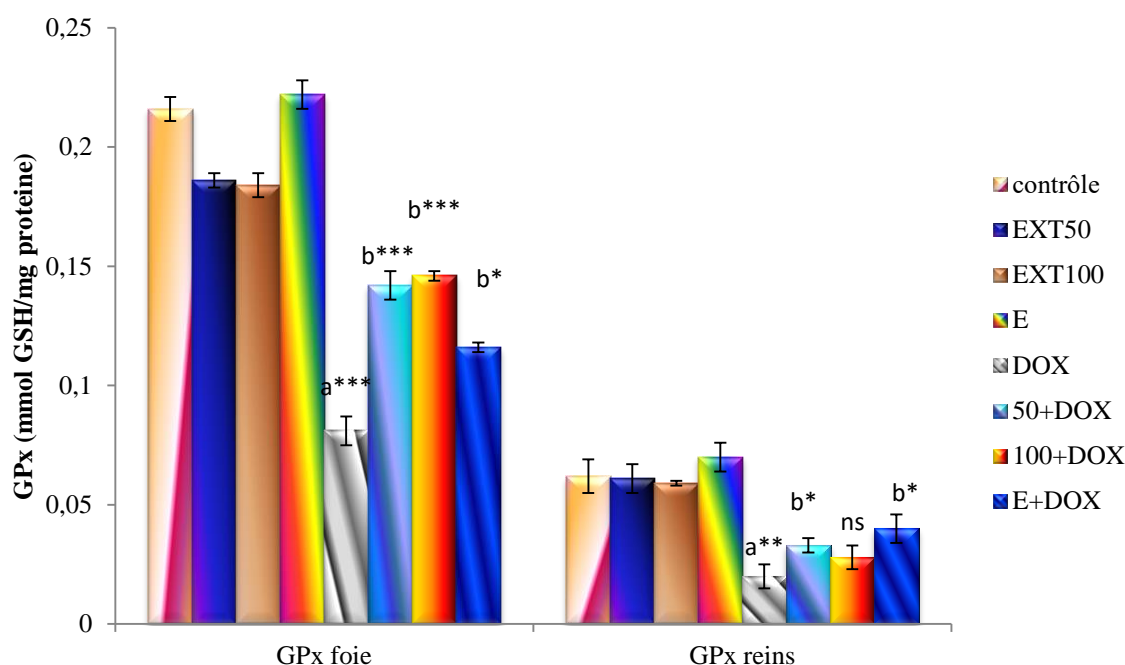


Figure 54 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur l'activité de GPx du foie et des reins chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,
 a : Groupe comparé au groupe témoin.
 b : Groupes comparés au groupe DOX.
 ns : non significative.

2.4.4. L'effet sur l'activité de la GPx du cœur

L'activité de l'enzyme GPx dans l'homogénat du cœur a été diminuée très hautement significative ($p < 0.001$) chez les rats traités par la DOX par rapport à celle mesurée chez les témoins. L'activité enzymatique de ce système antioxydant est conservée à son niveau normal chez les rats recevant la DOX et prétraités par l'extrait avec ses deux doses (50 et 100 mg/kg) par rapport au groupe DOX ($p < 0.01$) respectivement. Aussi bien une augmentation significative ($p < 0.01$) est observée chez les rats prétraités avec la vitamine E (100 mg/kg) (Figure 55).

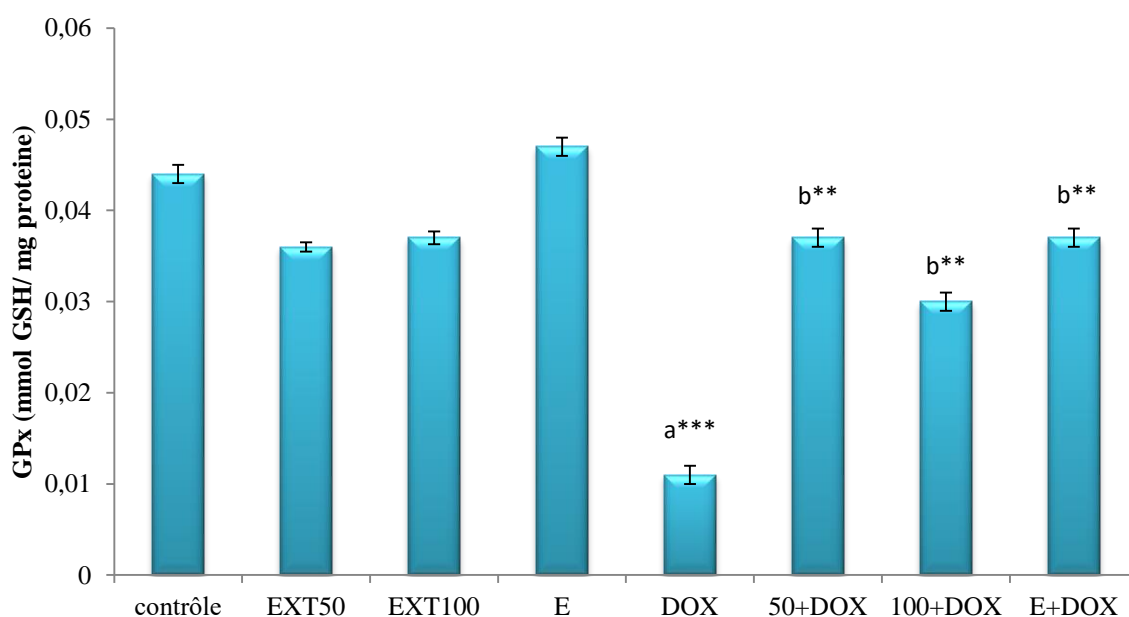


Figure 55 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur l'activité de GPx du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,
a : Groupe comparé au groupe témoin.
b : Groupes comparés au groupe DOX.
ns : non significative.

2.4.5. L'effet sur l'activité de catalase du foie et des reins

Selon les résultats présentés dans la (Figure 56), une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) et significative ($p < 0.05$) de l'activité de la catalase dans l'homogénat du foie et des reins respectivement chez les rats traités par la DOX par rapport à celle mesurée chez les témoins. L'activité enzymatique de ce système antioxydant est temporisée chez les rats prétraités par l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* au niveau du foie ($P < 0.01$) et des reins ($P < 0.05$) à la dose (50 mg/kg) par rapport au groupe DOX. La dose (100 mg/kg) présente une élévation très hautement significative ($P < 0.001$) seulement au niveau du foie. Alors qu'une élévation non significative est reconnue avec le prétraitement par la vitamine E (100mg/kg) au niveau des deux organes.

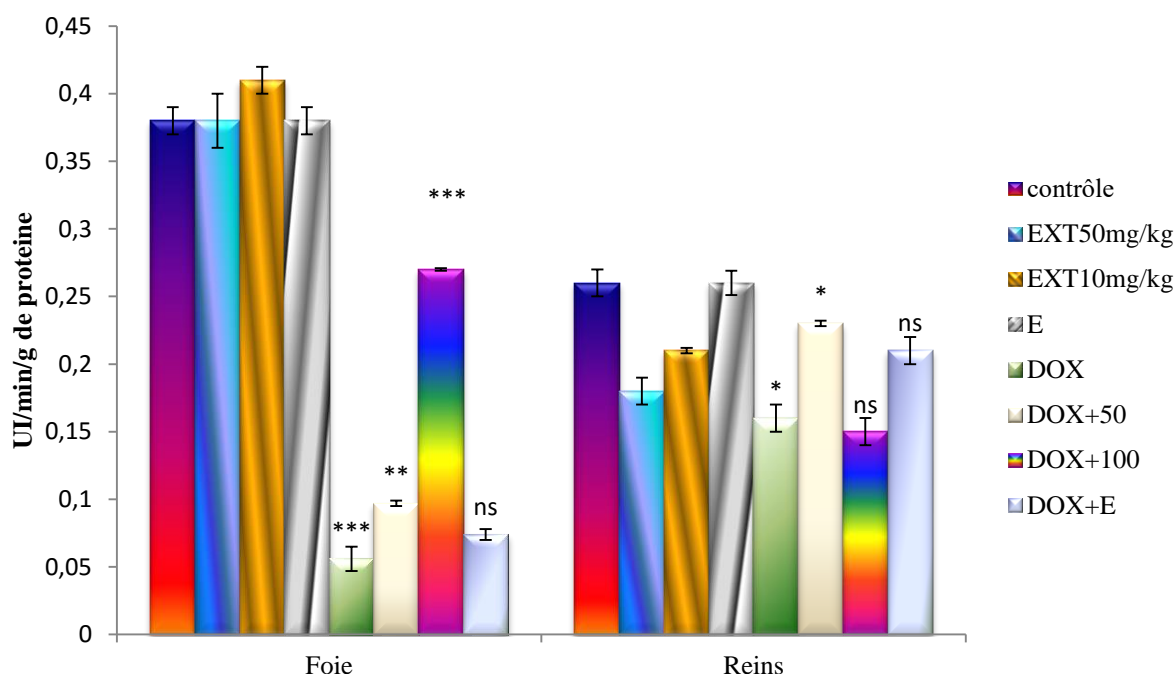


Figure 56 : Influence de l'administration de la DOX (10mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50,100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur l'activité de la catalase du foie et des reins chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type.

* : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.4.6. L'effet sur l'activité de catalase du cœur

Une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la catalase a été constaté chez les rats recevant la DOX par rapport au groupe témoin non traité. Par ailleurs, L'activité enzymatique de ce système antioxydant est conservée à son niveau normal chez les rats prétraités par l'extrait butanolique par rapport au groupe DOX ($p < 0.001$). Les mêmes résultats sont obtenus chez le groupe prétraité par la vitamine E (100mg/kg). Ces résultats prouvent probablement la protection des animaux par la vitamine E et l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* contre la toxicité cardiaque provoquée par la DOX (Figure 57).

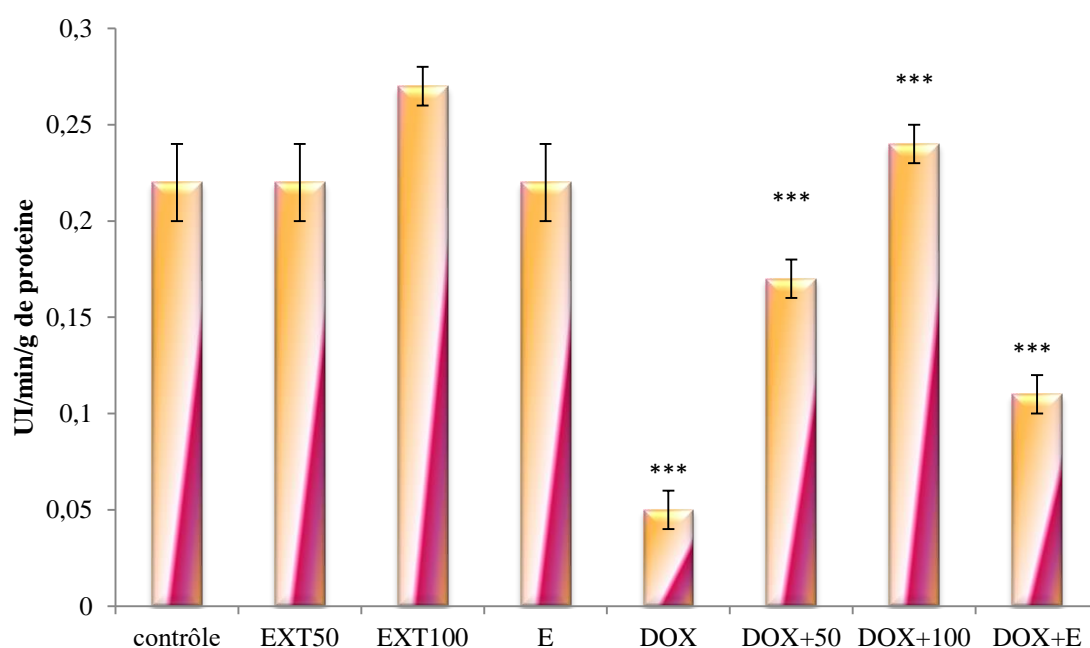


Figure 57 : Influence de l'administration de la DOX (15mg/kg), l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* (50, 100mg/kg) et la vitamine E (100mg/kg) sur l'activité de la catalase du cœur chez les différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm Ecart type. * : $P < 0.05$
** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$,

a : Groupe comparé au groupe témoin.

b : Groupes comparés au groupe DOX.

ns : non significative.

2.4. Discussion de l'étude expérimentale in vivo

La doxorubicine (DOX) est un médicament anticancéreux très efficace. Il est le meilleur antinéoplasique connu et le plus utilisé, entre autres dans le traitement de cancers tels que les leucémies et les tumeurs solides (Gançalo *et al.*, 2012). Néanmoins, ce médicament peut entraîner des effets secondaires et des complications sévères. Il est toxique pour tous les composants cellulaires, y compris le matériel génétique, les reins, le cœur et le foie (Sagar *et al.*, 2012 ; Xiaoliang *et al.*, 2017).

La doxorubicine peut générer la formation de plusieurs radicaux libres (l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyl) à la suite du métabolisme oxydatif chez les rats (Quiles *et al.*, 2002). Par voie enzymatique, la forme quinone qui est la forme initiale de la doxorubicine peut être réduite en forme semiquinone par le gain d'un électron. Cette réduction peut être générée par des enzymes réductases telles que la xanthine oxydase, la NADH déshydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase. L'électron perdu par la semiquinone de la doxorubicine lors de son oxydation peut être transféré à une molécule d'oxygène (O₂) pour former l'anion superoxyde (O₂^{•-}) qui sera également oxydé par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). A ce stade, le (H₂O₂) peut entraîner la formation de radicaux hydroxyles (OH[•]), un des radicaux libres les plus réactifs et destructifs, mais peut aussi être éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase (Sou *et al.*, 2017). Par voie non enzymatique, la DOX peut réagir également avec le Fe³⁺ dans une réaction redox et le complexe (fer-DOX) produit peut réduire l'oxygène et conduire à la formation du peroxyde d'hydrogène et d'autres espèces réactifs de l'oxygène (Rašković *et al.*, 2011).

Notre étude a pour but d'évaluer l'effet biologique protecteur des extraits butanoliques des plantes médicinales *H. confertum* et *H. ruficomum* sur la toxicité aigüe provoquée par la doxorubicine avec des doses de (10 mg/kg et 15 mg/kg), au niveau du cœur, foie et reins des rats mâles de la race *Wistar albinos*.

Les résultats obtenus montrent un grand déséquilibre dans la fonction des différents organes étudiés chez les rats traités par la doxorubicine par rapport au groupe témoin.

Nos constatations biochimiques ont montré que la doxorubicine avec les deux doses (10 mg/kg et 15 mg/kg) provoque une hépatotoxicité. Ces résultats concordent avec ceux des études

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

qui trouvent que ce médicament perturbe le métabolisme basal en montrant des effets toxiques surtout dans le foie (Durak et al., 1998).

Les transaminases sériques ont toujours été considérées comme des marqueurs sensibles des dommages de la fonction hépatique. Une augmentation sérique de ces enzymes reflétant une lyse cellulaire principalement au niveau du foie. L'altération de la perméabilité membranaire des hépatocytes endommagés conduit à la fuite des enzymes et l'augmentation des niveaux d'ALT et d'AST dans le sérum (Mohan *et al.*, 2011).

Dans cette étude les rats traités par La DOX (10mg/kg) ont montré une augmentation significative d'AST ($p < 0,01$), alors qu'avec la DOX (15mg/kg) ont montré une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) des concentrations sériques d'ALT et d'AST respectivement en comparaison avec le groupe témoin non traité (Saad *et al.*, 2001 ; Raskovic' *et al.*, 2011). Par rapport au groupe témoin on a constaté également une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) au niveau du cholestérol chez le groupe traité par la DOX (10mg/kg et 15mg/kg) et une augmentation non significative au niveau des triglycérides chez le groupe traité par la DOX (10mg/kg).

L'évaluation de l'effet de la DOX sur la fonction rénale est basée dans cette étude sur le dosage des marqueurs biochimiques telle que la créatinine sérique et l'urée. Ce dernier est l'un des premiers marqueurs qui a été utilisé pour mesurer le débit de filtration glomérulaire (Boutabet *et al.*, 2011).

La créatinine est strictement éliminée par les reins, son dosage est employé dans l'évaluation de la fonction rénale et plus particulièrement dans l'estimation du débit de filtration glomérulaire. Une élévation de sa concentration dans le sang est une indication de dysfonctionnement rénal et les données sur sa concentration sanguine et urinaire peuvent être utilisées pour estimer le taux de filtration glomérulaire (Lahouel *et al.*, 2010).

Dans la présente étude, nous avons trouvés que 15mg/kg de DOX augmente significativement la concentration sérique de la créatinine ($p < 0,01$), ainsi que la concentration d'urée, où on observe une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) en comparaison au groupe témoin.

Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études (Mohan *et al.*, 2011). Parmi ces études, plusieurs travaux montrent que l'administration de la DOX peut provoquer une augmentation des

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

marqueurs biochimiques de la fonction rénale par l'induction du stress oxydant (Boutabet *et al.*, 2011 ; Momin *et al.*, 2012 ; Shivani *et al.*, 2014).

L'estimation de l'effet toxique de la DOX sur le cœur et principalement sur les cellules cardiaques a été déterminée par le dosage de l'enzyme LDH qu'est utilisée comme un indicateur biologique pour déterminer le taux des dommages cardiaques.

Les résultats de notre étude montrent que les rats traités par une seule dose de la DOX (15mg/kg) présentent une augmentation sérique très significative du taux de l'enzyme LDH ($p < 0,001$).

Ces résultats sont cohérents avec ceux de (Mohamed *et al.*, 2000 ; Assiri et Afi, 2003 ; Deepa et Varalakshmi, 2003 ; Andreadou *et al.*, 2007). Les travaux de (Assiri et Afi, 2003) montrent que l'injection *ip* d'une dose de (30mg/kg) aux rats, provoque après 48h des dommages du muscle cardiaque conduisant à une augmentation du taux des enzymes (LDH, CPK). Ainsi, l'injection *ip* d'une mono dose de doxorubicine de (20mg/kg) provoque une augmentation de ces deux enzymes (Mohamed *et al.*, 2000). Dans une autre étude, (Andreadou *et al.*, 2007), les rats mâles qui ont subis une toxicité par la DOX avec une dose de (15mg/kg) présentent une augmentation significative du taux des enzymes : LDH, CPK, AST après un seul jour de l'injection. L'étude de (Deepa et Varalakshmi, 2003) trouve qu'une injection intra veineuse d'une dose de (7.5mg/kg) est suffisante pour provoquer un dommage aux cellules cardiaques et augmenter par conséquence significativement l'activité de ces enzymes (LDH, CPK, AST).

L'augmentation significative du taux sérique de l'enzyme LDH chez les rats traités par la DOX peut être due au déséquilibre de la membrane plasmique des cellules cardiaques. En effet les espèces réactives de l'oxygène générés après le métabolisme de la DOX peuvent affecter la fluidité membranaire des cellules cardiaques, tout en provoquant une peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (Deepa et Varalakshmi, 2003).

Selon les travaux de Sou, l'injection des souris mâles (ICR) par une seule dose de DOX (20mg/kg ; *ip*) cause une augmentation du taux d'LDH, une élévation de taux d'MDA et une réduction de taux de GSH au niveau de cœur (Sou *et al.*, 2017).

Le stress oxydant est le mécanisme par lequel la doxorubicine provoque une toxicité. La peroxydation lipidique représente un marqueur clé de stress et elle est déterminée par la mesure

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

d'MDA (Sou *et al.*, 2017). Dans le cas d'une toxicité rénale, hépatique et cardiaque la mesure des produits de la peroxydation lipidique peut refléter le degré du stress oxydant qui affecte ces trois organes. La peroxydation lipidique est un processus médié par les radicaux libres, conduisant à la dégradation oxydative des lipides polyinsaturés (Kakkar *et al.*, 1997). L'augmentation du taux d'MDA est le résultat d'augmentation des ROS qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire en provoquant une peroxydation lipidique (Rintala *et al.*, 2000).

L'augmentation de la peroxydation lipidique affaiblit le fonctionnement des membranes par la baisse de la fluidité membranaire et par la diminution de l'activité des enzymes ainsi que des récepteurs liés aux membranes (Kuka *et al.*, 2012).

Le traitement des rats avec les deux doses de la DOX (10mg/kg et 15mg/kg) augmente significativement le taux d'MDA au niveau du foie ($p < 0,001$ et $p < 0,01$) respectivement (Sagar *et al.*, 2012 ; Shivani *et al.*, 2014), au niveau des reins ($p < 0,001$) et au niveau du tissu cardiaque ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) respectivement par rapport à la normale (Momin *et al.*, 2012 ; Basavaraj *et al.*, 2013). L'augmentation du taux d'MDA chez les rats traités par la DOX avec les deux doses est le résultat de la peroxydation lipidique, qu'est un indicateur d'une toxicité médicamenteuse.

Autre étude (Yeh *et al.*, 2009), sur des rats mâles de la race *Sprague-Dawley* qui ont subis une toxicité par la DOX a provoqué une augmentation significative du taux d'MDA et une réduction significative de l'activité des enzymes antioxydantes GPx et CAT.

En effet le glutathion réduit (GSH) est un piègeur direct des radicaux libres. Il est aussi cofacteur de la GPx (Valko *et al.*, 2007), chélateur des métaux de transition et régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. Les changements dans l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible au stress oxydant (Crabb *et al.*, 1995 ; Sou *et al.*, 2017).

Dans la présente étude, nous avons trouvé que l'injection des rats par la DOX avec les deux doses (10mg/kg et 15mg/kg) a diminuée significativement le taux de GSH au niveau du foie ($p < 0,001$), des reins ($p < 0,001$) ainsi qu'au niveau du cœur ($p < 0,001$) toujours par rapport au groupe témoin non traité. Cela indique que la DOX a une toxicité médicamenteuse très élevée qui peut affecter le mécanisme de défense antioxydant. Ces résultats confirment les travaux de

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

(Yeh *et al.*, 2009 ; Lahouel *et al.*, 2010 ; Kebsa *et al.*, 2014). Ces résultats concordent également avec ceux de (Ashour *et al.*, 2012) qui trouve que le taux de GSH au niveau de tissu cardiaque est diminué par l'injection d'une dose de 15mg/kg (*ip*) aux rats pendant 10 jours.

La modification de l'équilibre des enzymes antioxydantes causée par la baisse de l'activité de la GPx et de la CAT peut être responsable de l'insuffisance des défenses antioxydantes dans la lutte contre les ROS ce qui provoque des dommages tissulaires (Deshpande *et al.*, 1996). La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH en ROH^{*}, et démontre le rôle de la sélénocystéine située dans le site catalytique de la protéine (Forstrom *et al.*, 1978). La DOX non seulement augmente la production des radicaux libres dans les tissus hépatiques, rénales et cardiaques mais aussi diminue les capacités antioxydantes (Mingning *et al.*, 2017).

Dans notre étude les niveaux de GPx et la CAT diminuent très hautement significative au niveau du foie, des reins et du cœur ($p < 0,001$) chez les groupes traités par les deux doses (10mg/kg et 15mg/kg) par rapport au groupe témoin.

La diminution des activités de GPx et du CAT dans les tissus hépatiques, rénales et cardiaques indiquent que la DOX a des effets toxiques. Ces changements observés dans la capacité de défense antioxydante peuvent être les résultats d'une toxicité induite par la DOX. Ces résultats confirment les travaux de (Amany *et al.*, 2004 ; Injac *et al.*, 2009).

Dans une étude de Francis et Yogendra, une augmentation sérique de l'enzyme LDH et une diminution de l'activité de la catalase était observé au niveau du cœur après l'injection des souris mâles BALB/c avec une seule dose de 20mg/kg de DOX (Francis et Yogendra, 2017).

Kocahan et autres montrent dans une autre étude que l'administration de la DOX aux rats à une dose (1,8 mg/kg) pendant 3 semaine augmente le taux d'MDA et diminue le taux de GSH et l'activité des enzymes antioxydantes GPx et catalase au niveau du foie et des reins (Kocahan *et al.*, 2017). Ainsi, dans la même étude, le prétraitement des rats avec la quercétine diminue le taux d'MDA et augmente le taux de GSH au niveau du foie et des reins.

Les résultats de notre étude histologique montrent que le traitement des rats mâles par 10 mg/kg de la DOX provoque des changements morphologiques au niveau du foie et des reins. On observe une présence focale des hépatocytes clarifiées en début de nécrose (70%) et une petite

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

dilatation des capillaires sinusoidaires, alors qu'au niveau rénal on observe des cellules tubulaires en début de nécrose (une liquéfaction tubulaire) dans les reins de groupe DOX. Les résultats obtenus sont conformes avec les recherches de (Rašković *et al.*, 2011).

Dans l'étude de Gonçalo *et al.*, l'administration de la DOX à une dose seulement de (2mg/kg) pendant 7 semaines aux rats mâles de la race *Wistar albinos* cause également des changements morphologiques, et une nécrose a été notée au niveau du tissu hépatique et rénale (Gonçalo *et al.*, 2012).

En revanche chez les groupes prétraités par les extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* avec ces deux doses (50 et 100mg/kg), on a constaté une augmentation significative des enzymes antioxydantes telle que : le GPx et la CAT au niveau du foie, reins et cœur cela et par rapport au groupe traité par la DOX. Ainsi que les rats recevant les extraits butanoliques comme un prétraitement, on a remarqué une normalisation du taux d'MDA et une normalisation de taux du GSH au niveau de ces trois organes. Les résultats confirment l'effet protecteur des plantes médicinales et principalement des flavonoïdes déterminé vis-à-vis de la toxicité (Hodnick *et al.*, 1986 ; Damodara *et al.*, 1991 ; Boutabet *et al.*, 2011). Nos résultats montrent que les extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* peuvent protéger les cellules et les structures sous-cellulaires contre les dommages oxydatifs en réduisant les niveaux d'MDA.

Concernant les groupes prétraités par les deux doses des extraits butanoliques, on a constaté également une diminution significative du niveau sérique d'AST et d'ALT bien que l'administration de l'extrait butanolique a temporisé l'effet de la DOX et a normalisé les valeurs d'AST et d'ALT par rapport au groupe traité par la DOX uniquement. Ces résultats ressemblent à plusieurs travaux réalisés sur les anticancéreux (Rašković *et al.*, 2011 ; Summya *et al.*, 2013).

En conséquence, nos études biochimiques ont indiqué que la DOX à la dose (10 et 15 mg/kg) a causé une hépatotoxicité qui a été empêché par les extraits butanoliques. On distingue aussi que les rats prétraités par les extraits butanoliques ont des valeurs de cholestérol et des triglycérides normales cela prouve que les extraits butanoliques ont temporisés significativement ($p < 0,01$) la valeur du cholestérol ainsi que celle des triglycérides, qui nous conduisent à dire que nos extraits butanoliques ont un effet protecteur contre les maladies des vaisseaux (Damodara *et al.*, 1991 ; Devaraj *et al.*, 2010).

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

Les mêmes résultats ont été détecté concernant les paramètres biochimiques de la fonction rénale ainsi que la fonction cardiaque, où on trouve que l'extrait butanolique de la plante *H. ruficomum* a diminuée significativement la concentration sérique de l'urée et de la créatinine, ainsi que le taux d'LDH. Ces modifications sont dues à l'effet antioxydant des extraits butanoliques. Les travaux de (Doroshov, 1983 ; Quiles *et al.*, 2008 ; Marie *et al.*, 2010 ; Ayla *et al.*, 2011).

D'autre part, le prétraitement avec l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* avec ses deux doses (50 et 100mg/kg) a diminué les changements morphologiques provoqués par la doxorubicine (10mg/kg) au niveau du foie par rapport au groupe témoin, où on observe : une petite dilatation des capillaires sinusoidaires, une conservation de l'architecture et de la cytologie, cependant une présence focale des hépatocytes clarifiées en début de nécrose (30 et 50%) respectivement. Finalement, ces résultats conforment les travaux de (Summya *et al.*, 2013). Le même effet protecteur de l'extrait avec les doses (50 et 100 mg/kg) a été observé au niveau des reins traités par la DOX où on observe des tubules et des glomérules presque normaux dans l'examen microscopique par rapport au groupe DOX.

Dans une autre étude, où la quercétine est co-administrée aux quarante rats mâles de la race *Wistar albinos* avec une dose de 20mg/kg de la DOX, Yagmurca et d'autres trouvent que le prétraitement des rats avec la quercétine a diminué les changements morphologiques au niveau des reins (Yagmurca *et al.*, 2015).

Selon notre étude, on a constaté que le rôle protecteur de la vitamine E à la dose (100mg/kg) sur la toxicité aigüe induite par la DOX à la dose de (15mg/kg) résulte une diminution significative du taux des transaminases (AST, ALT), d'urée, de la concentration plasmatique de la créatinine ainsi que d'LDH. La même dose de la vitamine E (100mg/kg) provoque une réduction significative du taux d'MDA aux niveaux des trois organes. En effet cette dernière a un effet antioxydant contre les radicaux libres qui provoquent la peroxydation lipidique produite lors du traitement avec la DOX.

De nombreuses études ont prouvées que la vitamine E est capable de neutraliser la peroxydation lipidique grâce à son effet piègeur de l'oxygène (Quiles *et al.*, 2002 ; Kalender *et al.*, 2004). Mais certains chercheurs ont mentionné précédemment, que l'effet de la vitamine E est observé uniquement avec une dose journalière de 200 mg / kg / jour (Kozluca *et al.*, 1995 ; Kalender *et al.*, 2002).

Deuxième partie : Etude expérimentale in vitro et in vivo

La vitamine E protège les cellules et les structures sous-cellulaires contre les dommages oxydatifs en réduisant les niveaux de l'MDA. La vitamine E n'avait pas d'effets toxiques aux doses prescrites, ce qui correspond avec nos résultats, ceci indique que la vitamine E est capable de piéger les ROS et principalement l'oxygène singulet.

Selon nos résultats, cette vitamine permis d'améliorer la capacité de défense antioxydante. Une augmentation significative de l'activité des enzymes antioxydantes telle que la GPx et la CAT a été observée.

Les résultats de la présente étude montrent que la DOX est un traitement anticancéreux qui possède une toxicité élevée due principalement à la génération des radicaux libres et montrent que les extraits butanolique des plantes *Helianthemum confertum* et *Helianthemum ruficomum* ont un effet protecteur très important vis-à-vis du stress oxydatif induit par la DOX à la dose (10 et 15mg/kg) au niveau du foie, reins et cœur. L'effet protecteur observé des extraits est due principalement à leur teneur en flavonoïdes qui ont la capacité de se débarrasser efficacement des métabolites d'oxygène et jouent un rôle important dans la protection des tissus contre la toxicité induite par la DOX.

Conclusion générale

Dans la présente étude, les extraits des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* montre une richesse en polyphénols avec un taux élevé des flavonoïdes. Ces composés phénoliques s'avèrent d'un pouvoir anti cancéreux et anti radicalaire important comparés à la vitamine C.

D'une part, l'évidence de la toxicité aigüe par l'injection intra péritonéale (*ip*) d'une dose de (10mg/kg ou 15mg/kg) de la doxorubicine est confirmée. Cet anticancéreux est susceptible de causer un dommage profond suite à la production intensive de radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire au profit des prooxydants. En effet, il a été constaté que les systèmes de défense antioxydant (GPx, CAT et GSH) ont été significativement diminués au niveau des organes étudiés (foie, reins et cœur). Par contre on a estimé une augmentation de taux d'MDA l'un des principaux produits de la peroxydation lipidique. L'augmentation des transaminases AST et ALT indiquant une peroxydation lipidique des membranes des cellules hépatiques. Aussi bien, l'augmentation de l'urée, la créatinine et l'enzyme LDH prouve la toxicité induite par cet anticancéreux au niveau du foie, reins et cœur respectivement.

D'autre part, l'étude a démontré que le prétraitement par les extraits joue un rôle chémoprotecteur vis-à-vis du stress oxydatif produit dans le cytosol de l'hépatocyte, les reins et le tissu cardiaque lors de l'injection de la doxorubicine aux animaux de laboratoire. On observe une diminution significative au niveau des paramètres biochimiques et de taux d'MDA, et une élévation significative de taux de GSH, et a l'activité des enzymes antioxydant telle que la CAT et le GPx. L'étude histologique confirme aussi l'effet protecteur de la plante *H. confertum* ou on observe une réduction de pourcentage des changements morphologique au niveau de foie et des reins. Car ils possèdent une activité antioxydante par leur pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène.

En conclusion, les extraits des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* contient des substances intéressantes en thérapeutique, par leur pouvoir antioxydant et chémoprotecteur dans les trois organes (foie, reins et cœur).

Références Bibliographique

REFERENCES

Abay G., Altun M., Koldas S., Tufekci AR., Demirtas I. (2015). Determination of Antiproliferative Activities of Volatile Contents and HPLC Profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb. Chem. High T. Scr.* 5: 453-463.

Ahmane A., Hocine G., Karim B., Meriem B. (2014). Les interactions médicamenteuses d'ordre pharmaco-cinétique : des mécanismes à l'importance clinique ? *J Med Sci.*1 :85-95.

Ahmed OM., Mohamed BA., Alaa SA. (2017). The Preventive Effects of Navel Orange Peel Ethanolic Extract and Naringin On Doxorubicin-Induced Nephrocardiotoxicity in Male Albino Rats. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research.* 7 (7): 109-125.

Akman O., Yunusemre Ö., Seçkin Ö., Ertan O., Nergis U., Tevfik Z., Necdet CL., Mehmet T., Ömer U. (2015). Erythropoietin Hormone and ACE Inhibitor Protect the Sperm Parameters of Adult Male Rats Against Doxorubicin Toxicity. *Research Article.* DOI: 10.9775/kvfd.2015.13412.

Alishahi A., Valiollah DR., Hedayyati M. (2013). Pretreatment Effects of Regular Aerobic Training on the IGF System and Hepatotoxicity Induced by Doxorubicin in Rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 14:7427-7431.

Amany MA., Heba MT. (2004). The protective effect of garlic against adriamycin cardiomyopathy: experimental study; *el-minia med., bull.* 15(2): 284-259.

Andreadou I., Sigala F., Iliodromitis EK., Papaefthimion M., Sigalas C., Aligiannis N., Savvari P., Gorgoulis V., Papanalabros E., Kremastinos DT. (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of nuclear and cellular cardiology.* 42: 549-558.

Ángela RM., Javier A., Begoña M., Javier P., Alonso V., José F., José GN., Raquel CL., Oussama A., Lourdes GG. (2013). Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology* 148 (2013) 287–296.

Ashour OM., Elberry Ahmed A., Alahdal Abdulrahman M., Al Mohamadi Ameen M., Nagy Ayman A., Abdel-Naim Ashraf B., Abdel-Sattar Essam A., Mohamadin Ahmed M. (2011). Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Med Sci Monit.* 17(4): 110-115.

Ashour OM., Ashraf BAN., Hossam MA., Ayman AN., Ahmed MM., Essam AAS. (2012). Evaluation of the Potential Cardioprotective Activity of Some Saudi Plants against Doxorubicin Toxicity. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen.* 67: 297 – 307.

Assiri AMA., Abdel-wahab A. (2003). Carnosine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 11: 23-31.

Références bibliographique

- Ayla S., Ismail S., Gamze T., Mujgan C., Mediha EBCSS., Gulperi O. (2011).** Doxorubicin Induced Nephrotoxicity: Protective Effect of Nicotinamide. *International Journal of Cell Biology*. 9 pages.
- Bahadir A., Nilgün K., Mine K., Engin Y. (2014).** The Role of Nitric Oxide in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Experimental Study, *Turk J Hematol*. 31:68-74.
- Balleter WG., Bushman CJ., Tidwell PW. (1961).** *Anal. Chem*. 33, 592.
- Banerjee A., Dasgupta N., De B. (2005).** In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*. 90: 727–733.
- Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*. 22: 266-72.
- Barthelemy N., Jansen N., Gennigens C., Delgaudine M., Coucke PA. (2012).** Y-a-t-il une place pour la radiothérapie en fin de vie. *Rev Med liége* .67(3) :128-132.
- Basavaraj C., Koti SN ., Agadihiremath V., Pramod C., Gadad AT. (2013).** Effet cardioprotecteur de védique garde contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine chez les rats : Un biochimique, électrocardiographique, et l'étude histopathologique. *Pharmacogn Mag*.9 (34): 176-181.
- Benabdelaziz I., Hamada H., Catherine L., Dominique H., Mohammed B. (2015).** Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Rec. Nat. Prod*. 9 (3): 342-348.
- Benabdelaziz I., Laurence M., Mohammed B., Wolfender JL., Hamada H. (2017).** Antioxidant and antibacterial activities and polyphenolic constituents of *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Natural Product Research*. 31 (6) :686–690.
- Beom SL., Jaewon O., Sung KK., Sungha P., Sang-HL., Donghoon Ch., Ji HCh., Youn WCh., Seok-Min K. (2015).** Insulin Protects Cardiac Myocytes from Doxorubicin Toxicity by Sp1-Mediated Transactivation of Survivin. *research article*.1-19. DOI: 10.1371/journal.pone.0135438.
- Bergmeyer HU., Scheibe P., Wahlefeld AW. (1978).** Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. *Clin. Chem*. 24 : 58-73.
- Bertrand J. (2007).** Un génome plein de trous et de bosses.2(23) :123-124.
- Beshay NMZ., Anwar AM., Mona EA., Ayman EK. (2011).** Acute Doxorubicin Toxicity Differentially Alters Cytochrome P450 Expression and Arachidonic Acid Metabolism in Rat Kidney and Live. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 39 :1440–1450.
- Bodin L. (2005).** Protocole de traitement naturel et complémentaires dans le cancer complémentaire. *Editions medecine-demain*. 987(2) :1-50.

Références bibliographique

- Bohm H., Boeing H., Hempel J. (1998).** Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *ZE nahrungswiss.* 37(2): 147-63.
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (2000).** A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 92 :295-302.
- Boutabet K., Kebsa W., Alyane M., Lahouel M. (2011).** Fraction polyphénolique de propolis algérienne protège les reins de rat contre le stress oxydatif aiguë induite par la doxorubicine. *.21 (2) : 101-106.*
- Braca A., De Tommasi N., Di Bari L., Pizza C., Politi M., Morelli I. (2001).** Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural products.* 64:892-895.
- Bravo L. (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 56(1): 317–333.
- Brian KB., Albert SB., Hong JK. (2009).** Addressing Reported Pro-Apoptotic Functions of NF-kB: Targeted Inhibition of Canonical NF-kB Enhances the Apoptotic Effects of Doxorubicin. *4 (9): 1-10.*
- Carole R. (2011).** Etude de la toxicité cardiaque des médicaments anticancéreux, thèse de doctorat, Spécialité : Physiopathologie Cardiovasculaire catalytic concentrations of enzymes. *Clin. Chem.* 24 :58-73.
- Chang WT., Jing L., Huang H-H., Huiping L., Mei H., Srinivasan R., Ch-Q Li., Willard W., Sharp Kimm J., Hamann Chun-Su., YuanTerry L., Vanden Hoek., Zuo-Hui Shao. (2011).** Baicalein Protects Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Attenuation of Mitochondrial Oxidant Injury and JNK Activation. *J Cell Biochem.* 112(10): 2873–2881.
- Chemam Y. (2017).** Valorisation de plantes sahariennes endémiques du genre *Helianthemum*-Activité antioxydante. Thèse de doctorat.
- Chen CT., Zhi HW., Cheng ChH., Hui HL., Jing HCh. (2015).** In Vivo Protective Effects of Diosgenin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Nutrients.* 7 : 4938-4954.
- Chira K., Suh JH., Saucier C., Teissedre PL. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie.* 6: 75–82.
- Chung SY., Hong W., GuangXun L., Zhihong Y., Fei G., Huanyu J. (2011).** Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research.* 64: 113-122.
- Claiborne A. (1985).** Catalase activity in *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed. Greenwald RA, pp. 283–284.

Références bibliographique

- Crabb DW. (1995).** Ethanol oxidizing enzymes: roles in alcohol metabolism and alcoholic liverdisease. *Prog Liver Dis.* 13: 151-172.
- Crozier A., Jaganath IB., Clifford MN. (2009).** Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 1001–1043.
- Damodara RV., Saayi Krushna G., Padmavathi P., Guengerich FP., Shimada T. (1991).** Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* 4: 391-407.
- Day AJ., Canada FJ., Diaz JC. (2000).** Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters.* 468: 166–170.
- Deepa PR., Varalakshmi P. (2003).** Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chemico-biological interactions.* 146 : 201-210.
- Defraigne JO., Pincemail J. (2007).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liege.* 62 (4) :1-4.
- Deshpande SS., Deshpande US., Salunkhe DK. (1996).** Nutrition and health aspects of food antioxidants. In Mdhavi DL., Deshpande SS., Salunkhe DK. *Food antioxidants, Technological, Toxicological, and Health perspectives.* Ed. Macel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong Kong :362-411.
- Devaraj S., Dasu MR., Jialal I. (2010).** Diabetes is a proinflammatory state: a translational perspective. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 5(1): 19-28.
- Dornfeld K., Michael M., Andrew S., Kendall BW. (2015).** Aspartate facilitates mitochondrial function, growth arrest and survival during doxorubicin exposure. *Cell Cycle* 14(20): 3282-3291.
- Doroshov JH. (1983).** Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide hydrogen peroxide and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res.* 43 : 4543–4551.
- Dumasa Ch., Yvette CL. (2014).** Etude cytochimique des polyphénols : généralités concernant les lignines et les sécrétions de tannins et d'aglycones flavoniques. *Lettres Botaniques.* 126 (2) : 123-142.
- Durak I., Ozturk HS., Kavutcu M., Birey M., Yel M., Guven T., Olcay E., Kacmaz M., Canbolat O. (1998).** Protective role of antioxidant vitamins on adriamycin-induced free radical production and cardiotoxicity in guinea pigs. *Cancer Res. Ther. Cont.* 5 : 133–141.
- Dutta AK., Siddique MA., Hossain S., Kabir Y. (2013).** Finlay green tea possesses the highest in vitro antioxidant activity among the 20 commercially available tea brands of Bngladesh. *Malaysin Journal of pharmaceutical Sciences.* 11 (2): 11-20.

Références bibliographique

El Amrani A., Khyatti M., Benhassou M., Attaleb Mohamed., Ennaji MM. (2013). Cancer du sein : Données Actuelles. ScienceLib Editions Mersenne. 5 :2111-4706.

Ellman GL. (1959). Plasma antioxidants. Arch. Biochemistry and Biophysics. 82 : 70-77.

Favier A. (2003). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. J l'actualité chimique .14 : 111-114.

Fetohi M., Errarhay S., Elmesbahi O., Ichou M., Errihani H. (2012). La cardiotoxicité des traitements adjuvants du cancer du sein. Mor J Cardiol. 7 :22-24.

Flohé L., Gunzler WA. (1984). Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105:114–121.

Flori RS., Wawaimuli A., Kenichi W., Meilei H., Punniyakoti TV., Rajarajan AT., Kenji S., Somasundaram A., Vivian S., Makoto K. (2011). Carvedilol Attenuates Inflammatory-Mediated Cardiotoxicity in Daunorubicin-Induced Rats, Pharmaceuticals. 4: 551-566.

Forstrom JW., Zakowski JJ., Tappel AL. (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine.17:2639-2644.

Fossati P., Prencipe L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin Chem. 28(10):77-80.

Francis A., Yogendra N. (2017). Modulation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Averrhoa bilimbi extract. J Young Pharm. 9(1) : 69-77.

Gagnon F., Deshaies P., Lepage-Saucier M. (2005). Travail, environnement et cancer, Le Médecin du Québec.40(10) :8-15.

Garazd., MM., Garazd YL., Khilya VP. (2003). Neoflavones. 1. Natural distribution and spectral and biological properties. Chem. Nat. Comp. 39 : 54-121.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003). Espèces Réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique. 91-96.

Gardes-Albert M., jore D. (1998). La radiolyse : une méthode efficace d'approche des mécanismes radicalaires antioxydants. J. Chim. Phys. 95 :763-766.

Georgiev V., Ananga A., Tsoleva V. (2014). Recent advances and use of grape flavonoids as nutraceuticals. Nutrients. 6 (1) : 391-415.

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. 4 : 162-169.

Références bibliographique

- Gonçalo CP., Susana PP., Claudia VP., Jose´ AL., Jose´ M., Antonio A., Maria SS., Antonio JM., Paulo JO. (2012).** Mitochondrionopathy Phenotype in Doxorubicin-Treated Wistar Rats Depends on Treatment Protocol and Is Cardiac-Specific. *plosone*. 7 (6) : 1-12.
- Goudable J., Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*. 11 :115-20.
- Grayer RJ., Veitch NC. (2006).** Flavanones and dihydroflavonols. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA. 918-1002.
- Guéritat J. (2015).** Exercice physique et progression du cancer de la prostate : effets combinés avec la prise d'antioxydant naturels ou la radiothérapie externe : identification de voies de signalisation redox-dépendant. Université de Rennes, 2.
- Guillaume M. (2009).** Conception et réalisation d'un bi microsystème base sur la d'électrophorèses et l'electrofusion en vue de l'immunothérapie du cancer. *Micro and nanotechnologies/Microélectroniques*. Ecole normale supérieure de Cachan (France) - ENS Cachan, thèse de doctorat.
- Gunzburg J. (2000).** Cancer : GTPases et supresseurs de tumeurs, *médecine/sciences* .16 : 487-91.
- Hahn VS., Danie JL., Bonnie K. (2014).** Cancer Therapy–Induced Cardiotoxicity: Basic Mechanisms and Potential Cardioprotective Therapies, *Journal of the American Heart Association*.10:1-14.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*.62 (10): 628-638.
- Hanušová V., Pavel T., Lenka K., Alena P, Iva B., Lenka S. (2013).** In vivo effect of oracin on doxorubicin reduction, biodistribution and efficacy in Ehrlich tumor bearing mice. *Pharmacological Reports*.65: 445-452.
- Hodnick WF., Kung FS., Roettger WJ., Bohmont C., Pardini RS. (1986).** Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol*. 35: 2345–2357.
- Hollman PCH., Buijsman MNCP., Y. van Gameren, P. J. Cnossen, J. H. M. de Vries, andM. B. Katan (1999).** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, vol. 31 (6): 569– 573.
- Ichikawa Y., Mohsen G., Marina B., Rongxue W., Arineh K., Sathyamangla V. NP., Kannan M., Tejaswitha JN., Hossein A. (2014).** Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*.124 (2): 617-629.

Références bibliographique

- Injac R., Boskovic M., Perse M. (2008).** Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress. *Pharmacol Rep.* 60:7–9.
- Kakkar R., Mantha SV., Radhi J., Prasad K., and Kalra J. (1997).** Antioxidant defense
- Kalender, S., Kalender, Y., Ates, A., Yel, M., Olcay, E., Candan S. (2002).** Protective role of antioxidant Vitamin E and catechin on idarubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 1379–1387.
- Kalender S., Kalender Y., Ogutcu A., Uzunhisarcikli M., Durak D., Acikgoz F. (2004).** Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of Vitamin E. *Toxicology.* 3: 227–235.
- Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K., Yano M. (1999).** Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3565-3571.
- Kebsa W., Hassiba R., Lahouel M. (2014).** Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27(6): 1891-1897.
- Khan G., Syed EH., Tarique AM., Neyaz A., Mohammad MS., Alam MF. (2014).** Cardioprotective effect of green tea extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research.* 71 (5): 8616868.
- Kocahan S., Zumrut D., Erman E., Eylem T. (2017).** Protective Effect of Quercetin Against Oxidative Stressinduced Toxicity Associated with Doxorubicin and Cyclophosphamide in Rat Kidney and Liver Tissue. *Iranian Journal of Kidney Diseases.* 11 (2): 124-131.
- Kris-Etherton PM., Hecker KD., Bonamone A. (2002).** Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113: 716 886.
- Kuka S., Tatarkova Z., Kaplan P. (2012).** Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *Acta Medica Martiniana.* 12(1): 5-11.
- Lahouel M., Kheira B., Wided K., Mohamed A (2010).** Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 4(10): 712-720.
- Lamberti M., Giancarlo G., Elpidio MG., Franca A., Antonia F., Stefania P., Vincenzo T., Marina DD. (2014).** Animal Models in Studies of Cardiotoxicity Side Effects from Antitubercular Drugs in Patients and Occupational Exposed Workers. *BioMed Research International.* 10: 1-8.

Références bibliographique

- Louisse J., Rob CI., Francesca P., Taina P., Manuela B., Peter M., Susanne B., Pilar P. (2017).** Assessment of acute and chronic toxicity of doxorubicin in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicology in Vitro*. 42: 182–190.
- Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL., Randal RJ. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 15: 265-275.
- Machado NG., Baldeiras I., Pereira GC. (2010).** Sub-chronic administration of doxorubicin to Wistar rats' results in oxidative stress and unaltered apoptotic signaling in the lung. *Chem Biol Interact*. 188:478–86.
- Mahmoud NN., Mahmoud AM. (2000).** Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*. 41(3):284-289.
- Malchair P., Van Overmeire L., Boland A., Salmon E., Pierard L., Seutin V. (2005).** LE COENZYME Q10 : biochimie, physiopathologie de sa carence et intérêt potentiel d'une augmentation de ses apports. *Rev Med Liege*. 60 (1): 45-51.
- Manach C., Regeat F., Texier O., Agullo G., Demigne C., Remesy C. (1996).** Bioavailability, Metabolism and physiological impact of 4- oxo-Flavonoids. *Nutrition Research*. 16(3): 517-544.
- Mangels AR. (1993).** The bioavailability to humans of ascorbic acid from oranges, orange juice and cooked broccoli is similar to that of synthetic ascorbic acid. *J. Nutr.*123: 1054-1061.
- Mansour MA., Hassan AE., Othman AS. (1999).** Effect of captopril on doxorubicin-induced nephrotoxicity in normal rats. *Pharmacological Research*. 39 (3): 233-237.
- Marie D., Dany L., Cannone P., Dudoit E., Duffaud F. (2010).** Représentations sociales du cancer et de la chimiothérapie : enjeux pour la définition de la situation thérapeutique. *Bull Cancer*. 97 (5) : 577-587.
- Marques-Aleixo I., Santos-Alves E., Torrella JR., Oliveira PJ., Magalhaes J., Ascensao A. (2017).** Exercise and Doxorubicin Treatment Modulate Cardiac Mitochondrial Quality Control Signaling. *Cardiovasc Toxicol*. DOI 10.1007/s12012-017-9412-4.
- Mauro MO., Renata M., Natan D., Regiane LBS., Rodrigo JO., Maria ÉAS, Cândida ALK., Maria FCM., Fábio JCF., Deiler SC. (2017).** Actions of sesquiterpene lactones isolated from *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* in MCF7 cell line and their potentiating action on doxorubicin. *Pharmacology and Toxicology*. 18 (53) :1-11.
- Michel D. (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*. 63 : 267-316.

Références bibliographique

- Mingning Q., Longzhi K., Sai Z., Xin Z., Zesong F., Jianjun L. (2017).** JS-K, a GST-activated nitric oxide donor prodrug, enhances chemo-sensitivity in renal carcinoma cells and prevents cardiac myocytes toxicity induced by Doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol.* DOI 10.1007/s00280-017-3359-9.
- Mohamed HE., El-swefy SE., Hagar HH. (2000).** The protective effect of glutathione Administration on adriamycin-induced Acute cardiac toxicity in rats. *Pharmacological Research.* 42: (2): 115-121.
- Mohammad AK., Mhaveer S., Masood SK., Wasim A., Abul KN., Sayeed A. (2014).** Alternative Approach for Mitigation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity using Herbal Agents. *Current Clinical Pharmacology.* 9 (3): 1-10.
- Mohan M., Kamble S., Satyanarayana J. (2011).** Protective effect of Solanum torvum on Doxorubicin- induced hepatotoxicity in rats. *Int J Drug Dev Res.* 3 :131–8.
- Momin F., Shabina S., Naziya K., Rutika J., Tabassum S., Nilofar N. (2011).** Cardioprotective effect of ixora coccinea linn. flower extract on doxorubicin induced cardiomyopathy in rats. *Pharmacologyonline.* 3: 1145-1158.
- Montaigne D., Christopher H., Remi N. (2012).** Mitochondria Death/Survival Signaling Pathways in Cardiotoxicity Induced by Anthracyclines and Anticancer-Targeted Therapies? Hindawi Publishing Corporation. 12 pages.
- Naito HK. (1984).** Cholesterol, in *Clinical Chemistry: Theory. Analysis and Correlation*, Kaplan L.A. and Pesce A.J. (eds.) St. Louis, MO: C.V. Mosby Co. P127.
- Nakagaw Y. (2004).** Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci.* 1011: 84-177.
- Narayana KR., Sripal RM., Chaluvadi MR., Krishna DR. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology.* 33: 2-16.
- Nirwane AM., Gupta PV., Patil RA. (2014).** Therapeutic Implications of Punica Granatum Seeds on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. *Austin J Pharmacol Ther.* 2(8):1-5.
- Nnenna AF., Harry WF., Melissa LK. (2011).** A Switching Mechanism in Doxorubicin Bioactivation Can Be Exploited to Control Doxorubicin Toxicity. *Computational Biology.* 7(9): 1-16.
- Octavia Y., Carlo GT., Kathleen LG., Stefan J., Harry JC., An LM. (2012).** Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52: 1213–1225.

Références bibliographique

- Ordonez AAL., Gomez JD., Vattuone MA., Isla MI. (2006).** Antioxidant activities of Sechiumedule (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*. 99: 452–458.
- Petra R., Veronika H., Lenka S., Hana B., Petra M., Iva B. (2014).** Effect of selected catechins on doxorubicin antiproliferative efficacy and hepatotoxicity in vitro. *Acta Pharm.* 64 : 199–209.
- Pincemail J., Degrune F., Voussure S., Malherbe C., Paquot N., Defraigne JO. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*. 21 : 66–75.
- Pincemail J., Heusele C., Bonté F., Limet R., Defraigne JO. (2001).** Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones – Nutrition*. 4 :158-164.
- Pincemail J., Lecomte J., Collart E., Castiaux J P., Defraigne JO. (2003).** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique, Vaisseaux, Coeur, Poumons. 6 (5) : 1-3.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne JO. (1998).** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Service de Chirurgie Cardiovasculaire*.35 : 1-4.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne JO. (1999).** Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* .4 (4).
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne JO. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* .4 (5) :1-7.
- Popovici C., Ilonka S., Bartek T. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4 : 25-39.
- Quezel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du C.N.R.S, Paris., Tome II, p. 714.
- Quiles, JL., Huertas JR., Battino M., Mataix J., Ramirez-Tortosa MC. (2002).** Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 180: 79–95.
- Rashikh A., Krishna KP., Shibli JA., Mohammad A., Abul KN. (2012).** Aliskiren alleviates doxorubicin-induced nephrotoxicity by inhibiting oxidative stress and podocyte injury. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*. 14(1): 14–22.
- Raskovic´ A., Stilinovic´ N., Kolarovic´ J. (2011).** The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules* 16 :8601–13.

Références bibliographique

- Rees JF., Franck Z., Thomé JP. (2004).** Enfer et paradis la toxicité de l'oxygène chez les organismes abyssaux. *Océanis*. 30(3): 277-291.
- Rintala J., Jaatinen P., Parkilla S., Sarvihararjum KK. (2000).** Evidence of acetaldehyde adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol*. 35 : 458-463.
- Rochefort H., Rouesse J. (2008).** Cancer du sein, incidence et prévention. *Bull. Acad. Natle Méd.* 192(1) :161-180.
- Rong ChCh., Xu DX., Xue ZL., Gui BS., Yin DZ., Xi D, Jian W., Hai JZ., Qiang Z., Xiao BS. (2015).** Total Flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze Protect against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Vitro and in Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 17 pages.
- Rossary A., Steghnes JP. (2013).** Marqueurs biologiques du stress oxydant. *EMC Biologie médicale*. 8(4) : 1-6.
- Saad SY., Najjar TA., Al-Rikabi AC. (2001).** The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 43:211–18.
- Sacco G., Rossella G., Emanuela S., Pierantonio M., Nicoletta B., Gallia G., Fabio A., Cristina G., Carlo AM., Stefano M., Giorgio M. (2003).** Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity, *British Journal of Pharmacology*. 139 : 641–651.
- Sagar LS., Vishal RM., Girish N Z., Subhash LB. (2012).** Activité cardioprotecteur de l'extrait de méthanol de fruits de *Trichosanthes cucumerina* sur cardiotoxicité induite par la doxorubicine-chez le rat Wistar. *Toxicol Int*. 19 (2) : 167-172.
- Sahna E., Parlakpınar H., Ozer MK., Ozturk F. (2003).** Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res*. 35: 257–61.
- Saller R., Meier R., Brignoli R. (2001).** The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 61(14) : 2035–2063.
- Savina P. (2014).** Le Curcuma, un agent naturel de lutte contre le vieillissement cutané. *Biologie et Biotechnologie*. 3-18.
- Shivani S., Neelima RK., Jaspreet K. (2014).** In vivo Studies on the Protective Effect of Propolis on Doxorubicin-Induced Toxicity in Liver of Male Rats. *Toxicol Int* May-Aug. 21(2): 191–195.

Références bibliographique

- Singleton VL., Orthofer R., Lamuela- Raventos RM. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer L, editor. *Methods in enzymol: oxidant and antioxidants (part A)*, 299. San Diego, CA: Academic Pres; 152-78.
- Sodergren E. (2000).** Lipid peroxidation *in vivo*: Evaluation and application of methods for measurement. Uppsala University, Medicinska vetenskapsomradet, Faculty of Medicine, Department of Public. Health and Caring Sciences. 78p.
- Sou HK., Keuk JK., Joung-Hee K., Jae-Hwan K., Hyun-Keun S., Joon YCh., Dae YH., Kil SK., Young-Suk J. (2017).** Comparision of doxorubicin-induced cardiotoxicity in the ICR mice of different sources. *Lab Anim Res* .33 (2) : 165-170.
- Spagnuolo RD., Recalcati S., Tacchini L., Cairo G. (2011).** Role of hypoxia-inducible factors in the dexrazoxanemediated protection of cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity, *British Journal of Pharmacology*, 163: 299–312.
- Spencer JE., Chaudry F., Pannala AS., Srail SK., Debnam E., Rice EC. (2000).** Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 272 (1): 236–241.
- Spierto FW., MacNeil ML., Burtis CA. (1979).** The effect of temperature and wavelength on the measurement of creatinine with the Jaffe procedure. *Clin Biochem*.12(1) :18-21.
- Sterba M., Olga P., Anna V., Eduard J., Petra K., Vladimír G., Tomas S. (2013).** Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *antioxidants & redox signaling*.18(8): 899-929.
- Summya R., Ali N., Nafees S., Ahmad ST., Arjumand W., Hasan SK., Sultana S. (2013).** Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicityand hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicol. Mech. Methods*. 23(5): 337–345.
- Tannock I., Hill RP. (1998).** *The basic science of oncology*, 3éd. New York: McGraw-Hill Health Professions Division.539 p.
- Teixeira J., Daniel Ch., Fernanda B., Lech W., Mariusz R.W., Anieszka K.W, Paulo J.O. (2017).** Dietary Polyphenols and Mitochondrial Function: Role in Health and Disease. *Current Medicinal Chemistry*. 24: 1-27.
- Thannickal VJ., Fanburg BL. (2000).** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:1005-1028.
- Thippeswamy AHM., Shirodka A., Koti BC., Jaffar Sadiq A. , Praveen DM., Viswanatha AH., Swamy M., Mahesh P. (2011).** Rôle protecteur de *Phyllanthus niruri* extrait de la toxicité myocardique induite par la doxorubicine chez des rats. *Indian J Pharmacol*.43 (1): 31-35.

Références bibliographique

- Tsao R., Yang R., Young JC., Zhu H. (2003).** Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51: 6347-6353.
- Tsao R (2010).** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2: 1231-1246.
- Uchiyama M., Mihara M. (1978).** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thribarbituric acid test. *Analytical Biochemistry.* 86: 271-278.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M., Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 39:44–84.
- Vejpongsa P., Edward TH., Yeh MD. (2014).** Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity, *journal of the american college of cardiology.* 64(9): 939-945.
- Vincent F., Boer J., Pfohl-Lezkowicz A., Cherel Y., Gal-gani F. (1998).** Two cases of ras mutation are associated with liver hyperplasia in *Callionymus lyra* exposed to polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogen.*21:121-127.
- Volkova M., Russell R. (2011).** Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Current Cardiology Reviews.*7:214-220.
- Weinberger V., Minář L., Brančíková D. (2012).** Ceska Gynekol. Modern surgical and biological therapy of breast cancer. *77(6):*513-20.
- Wilhelm S., Henk B., John A., Aalt B., Jack D., Richard MF., Christine G., Guido H., Peter H., Birgit H., Frank JK., Cristina P., Catherine RE., Susan S., Trinette V., Jos V., Gary W., Si^an BA. (2002).** Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine ;*23 :39–100.
- Xiaoliang L., Xiaoyu Y., Fan Ch., Dawei Ch. (2017).** Combined application of Doxorubicin and Naringin enhances the antitumor efficiency and attenuates the toxicity of Doxorubicin in HeLa cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 10(7):7303-7311.
- Xiuzhen H., Tao S., Hongxiang L. (2007).** Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8: 950-988.
- Yaghoglu AS., Akdulum B., Erenler R., Demirtas I., Telci I., Tekin S. (2013).** Antiproliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and (E)-1, 8-pentadecadiene from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. roots, *Med. Chem. Res.* 22(6): 2946-2953.
- Yagmurca M., Yasar Z., Bas O. (2015).** Effects of quercetin on kidney injury induced by doxorubicin. *Bratisl Med J.* 116 (8) :486 – 489.
- Yarmohmmadi F., Nastaran R., Hedyeh F.G., Nina J., Alireza A., Parvin P., Farahnaz J., Shahram E., Ahmad RD. (2017).** Protective effects of agmatine on doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rat. *European Journal of Pharmacology.* 796: 39–44.

Références bibliographique

- Yeh YC., Liu TJ., Wang LC., Lee HW., Ting CT., Lee WL., Hung CJ., Wang KY., Lai HC. (2009).** A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *British Journal of Pharmacology*. 156: 48–61.
- Yilmaz S., Atessahin A., Sahna E. (2006).** Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*. 218:164–71.
- Zhang F., Altork iNK., MestreJ. (1999).** Curcumin inhibits cyclooxygenase-2transcription in bile acid--and phorbol ester--treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*. 20 :445–451.
- Zhao, F., Watanabe, Y., Nozawa H., Daikonnya A., Kondo K., Kitanaka S. (2005).** Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from Hops (*Humulus lupulus*). *J. Nat. Prod.* 68: 43-49.
- Zhu W., Jia Q., Wang Y., Zhang Y., Xia M. (2012).** The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP/PKA-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 52(2): 314–327.
- Zolfagharzadeh F., Valiollah DR. (2013).** Pretreatment Hepatoprotective Effect of Regular Aerobic Training Against Hepatic Toxicity Induced by Doxorubicin in Rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*.14: 2931-2936.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير الوقائي للمستخلص البيتا نولي لنبتي (*H. ruficomum*) (*H. confertum*) على السمية الحادة المحرصة بواسطة دواء (Doxorubicine) عند الجرعتين (10mg/kg,) (15mg/kg) لدى ذكور الجرذان من سلالة (Wistar Albinos).

لقد تم التأكد في هذه الدراسة من الفعل السام لهذا الدواء إثر المعاملة عن طريق الحقن تحت الصفاق مرة واحدة، حيث أدت هذه الجرعة الي ظهور تسمم على مستوى النسيج الكبدي، الكلوي والقلبي. ويظهر ذلك من خلال ارتفاع نشاط المؤشرات البيو كيميائية للوظيفة الكبدية (AST و ALT) ; مؤشر الوظيفة القلبية (LDH) ومؤشرات الوظيفة الكلوية (urée و créatinine). كما ادت معاملة ذكور الجرذان بهاتين الجرعتين إلى تغيير معنوي في مستوى مؤشرات التوتر التأكسدي حيث لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى (MDA) وانخفاض في نشاط كل من (GSH و catalase و GPx).

أثبتت النتائج المتحصل عليها الدور الوقائي الذي يلعبه المستخلص البيتا نولي لكلا النبتتين (*H. ruficomum*, *H. confertum*) إذ ادت المعاملة المسبقة بهاذين المستخلصين عند الجرعتين (50mg/kg و 100mg/kg) لجرذان محقونة بالجرعتين (10mg/kg و 15mg/kg) إلى تعديل مستوى النظام الإنزيمي المضاد للأكسدة و نشاط كل من (GSH ، CAT و GPx) إضافة إلى انخفاض في الأكسدة الفوقية للدهون و كذلك تعديل مستوى المؤشرات البيو كيميائية وذلك راجع إلى احتواء المستخلصين على كميات معتبرة من الفينولات و الفلافونيدات التي لها القدرة على اقتناص الجذور الحرة المسببة لذلك ، و ذلك استدلالاً بالنتائج المتحصل عليها في الدراسة خارج العضوية

كما أعطى المستخلص البيتا نولي لنبات (*H. confertum*) تغيراً معنوياً في نسبة التغيرات المورفولوجية الكبدية والكلوية الناتجة عن الحقن بواسطة الدواء، حيث لوحظ غياب شبه كلي للخلايا التي تعرضت للنخر عند هذه المجموعات مقارنة بتلك المعاملة بالدواء فقط. كما تناولت هذه الدراسة التأثير الوقائي لفيتامين E على السمية الحادة المحرصة بالدواء عند الجرعة (100mg/kg) ضد التوتر التأكسدي الناتج في كل من الخلية الكبدية والكلوية والقلبية بواسطة قدرته هو الآخر على اقتناص الجذور الحرة وتحفيزه للنظام المضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية:

Doxorubicine، المستخلص النباتي، الفينولات، النشاط المضاد للأكسدة، *Helianthemum ruficomum* ، *Helianthemum confertum*، التوترا التاكسدي، الأكسدة الفوقية للدهون.

Résumé

Dans la présente étude, l'effet anti oxydants et protecteur des extraits butanoliques des plantes médicinales *H. confertum* et *H. ruficomum* est élucidé dans des expériences en utilisant des rats *Wistar albinos*. L'évidence de la toxicité sous l'effet de la doxorubicine (DOX) aux doses (10 et 15 mg/kg) est confirmée. Cet anticancéreux est susceptible de causer un dommage profond suite à la production intensive des radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire au profit des prooxydants.

Le traitement par la DOX induit une élévation au niveau des paramètres biochimiques telle que : le cholestérol, les triglycérides, l'urée, la créatinine, d'LDH et le taux des transaminases (AST, ALT) libérés une fois les cellules hépatiques lésées et leurs membranes perforées. Ainsi une augmentation de taux d'MDA (résulte de la peroxydation lipidique) est confirmée. La diminution de l'activité des enzymes antioxydants telle que : la catalase et le GPx et une diminution au niveau du taux de GSH est distinguée.

Les extraits butanoliques des plantes jouent un rôle chémoprotecteur vis-à-vis du stress oxydatif produit lors de l'administration de la DOX aux animaux de laboratoire. Car ils possèdent une activité antioxydant grâce à leurs pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène. Il ressort clairement de notre étude que les prétraitements par les extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* à des doses (50 et 100mg/kg) et la vitamine E à la dose (100mg/kg) tempore les niveaux des paramètres biochimiques et d'MDA. Ainsi, une normalisation des paramètres antioxydants tels que les enzymes antioxydantes (GPx et CAT) ou le GSH est rapporté.

Les résultats obtenus indiquent que les extraits butanoliques des deux plantes sont pourvus d'un pouvoir antiradicalaire et antioxydant pouvant jouer un rôle chémoprotecteur et préventif vis-à-vis la toxicité induite par la DOX.

Ces résultats sont confirmés par une étude histologique réalisé aux tissu hépatique et rénale des groupes traités par la DOX à la dose (10mg/kg) ou on observe des cellules nécrotiques, alors qu'aux niveaux des groupes prétraités par l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* avec ses deux doses (50 et 100mg/kg) on examine une présence focale des hépatocytes clarifiées en début de nécrose.

En conclusion, les extraits des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* montrent une richesse en polyphénols avec un taux élevé des flavonoïdes. Ces composés phénoliques s'avèrent d'un pouvoir anti cancéreux et anti radicalaire important comparés à la vitamine C.

Les mots clé : *Helianthemum confertum* et *Helianthemum ruficomum*, stress oxydative, activités anti oxydants, Doxorubicine, extraits des plantes, peroxydation lipidique, composes phénoliques.

Abstract

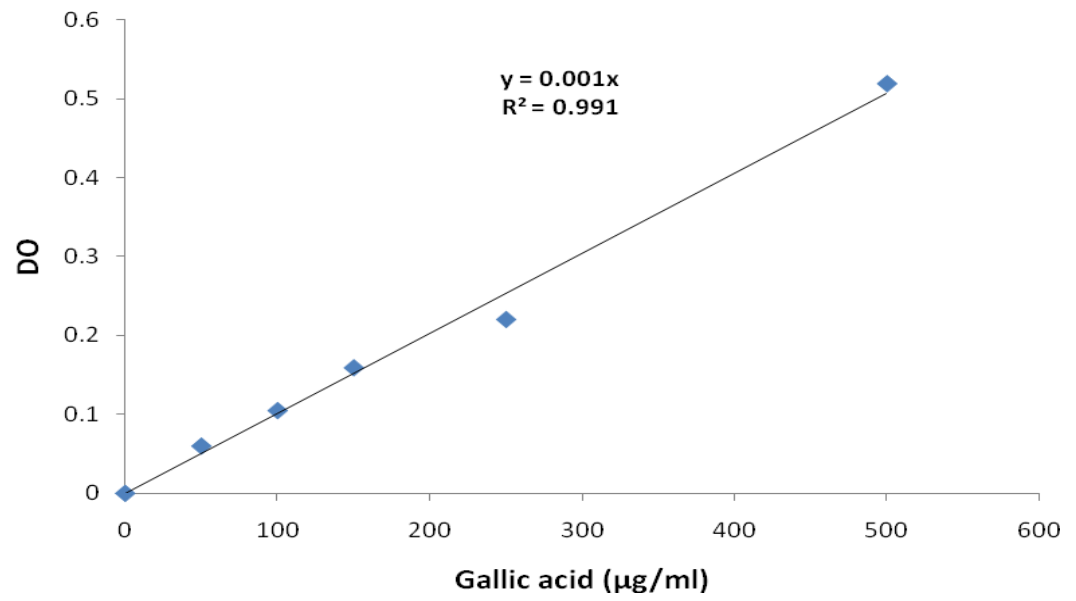
The present study aims to investigate the protective and antioxidant effects of *n*-butanol extracts of *H. confertum* and *H. ruficomum* plants in experimental rats. The *n*-butanol extract of those plants was evaluated in *Wistar Albinos* rats for its protective potentials against doxorubicin induced acute toxicity. The effect of *n*-butanol extracts of *H. confertum* and *H. ruficomum* at a dose of (50mg/kg and 100mg/kg) was studied on DOX-induced hepatic, kidney and heart damage. One dose of doxorubicin (10mg/kg and 15mg/kg) was injected intraperitoneal in *Wistar Albinos* rats. Serum transaminases, cholesterol, triglycerides, LDH, urea, creatinine, lipid peroxidation (MDA), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and catalase were estimated to assess liver, kidney and heart damage. It was found that combined *H. confertum* and *H. ruficomum* (50 and 100mg/kg) extract and DOX (10 and 15mg/kg) treatment decreased significantly TBARS level and biochemical parameters. In contrast increased reduced glutathione, glutathione peroxidase, and catalase activities compared to the DOX-group. Results of *in vivo* experiments showed that the *n*-butanol extracts of *H. confertum* and *H. ruficomum* inhibited lipid peroxidation, protected the experimental animals from hepatic and kidney toxicity and maintained the levels of antioxidant enzymes. The protective effect of vitamin E was also studied against doxorubicin-induced acute toxicity at (15mg/kg), and it was found that combined vitamin E (100mg/kg) and DOX (15mg/kg) treatment decreased significantly TBARS level and increased antioxidant activities.

Also, histological study was determined in pretreatment with *n*-butanol extract of *H. confertum* and doxorubicin induced acute toxicity at (10mg/kg), and it was found that combined *H. confertum* *n*-butanol extract at (50 and 100mg/kg) decreased necrotic cells in hepatic tissue.

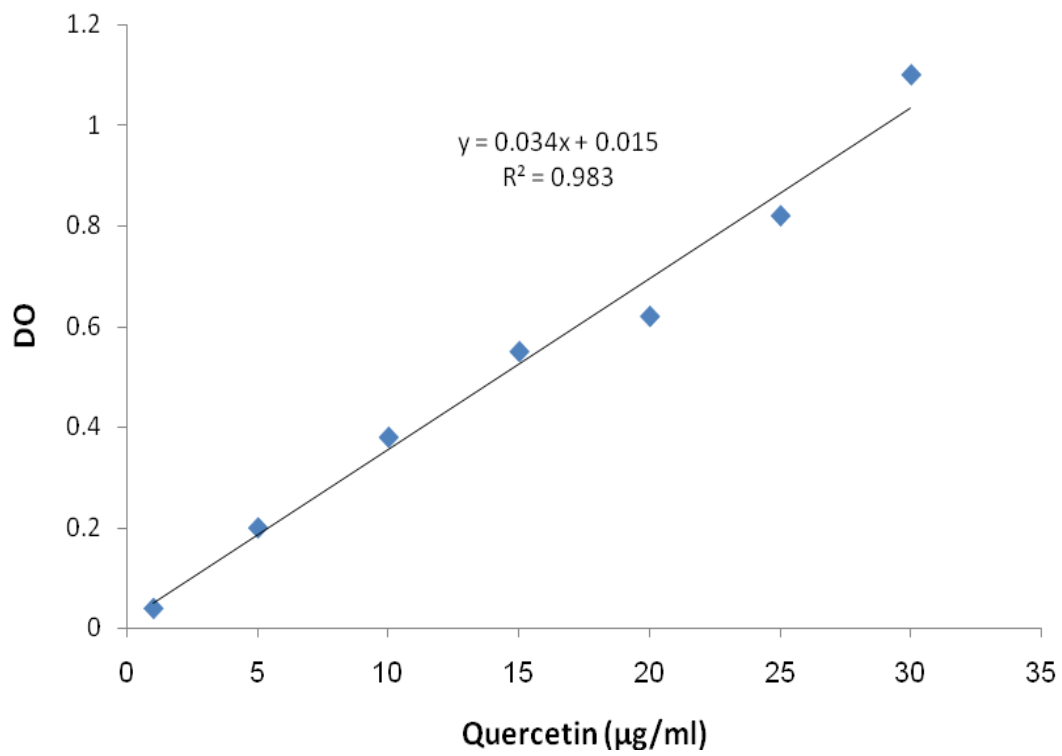
The antioxidant *in vitro* tests (DPPH scavenging, inhibition of LPO and anti-cancer activity) of *n*-butanol extracts of *H. confertum* and *H. ruficomum* indicated that different function as free radical scavengers, such activities are more strongly correlated with the levels of flavonoids and total phenols.

Keywords: *Helianthemum confertum* and *Helianthemum ruficomum*; oxidative stress; Doxorubicin; Antioxidant activities; lipid peroxidation; Plant extract; Phenolic compounds.

ANNEXES



acide gallique comme standard" "Courbe étalon du dosage des phénols totaux :Figure répétitions Moyenne de 3



quercitine comme standard "Moyenne" Courbe étalon du dosage des flavonoïdes :Figure répétition 3 de

Nom : DJEBBARI

Prénom : Radja

L'effet protecteur des extraits des plantes *Helianthemum confertum* et *Helianthemum ruficomum* vis-à-vis de la toxicité induite par la Doxorubicine : Etude *in vitro* et *in vivo*
Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle

Résumé :

Dans la présente étude, l'effet anti oxydants et protecteur des extraits butanoliques des plantes médicinales *H. confertum* et *H. ruficomum* est élucidé dans des expériences en utilisant des rats Wistar albinos. L'évidence de la toxicité sous l'effet de la doxorubicine (DOX) aux doses (10 et 15 mg/kg) est confirmée. Cet anticancéreux est susceptible de causer un dommage profond suite à la production intensive des radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire au profit des prooxydants.

Le traitement par la DOX induit une élévation au niveau des paramètres biochimiques telle que : le cholestérol, les triglycérides, l'urée, la créatinine, d'LDH et le taux des transaminases (AST, ALT) libérés une fois les cellules hépatiques lésées et leurs membranes perforées. Ainsi une augmentation de taux d'MDA (résulte de la peroxydation lipidique) est confirmée. La diminution de l'activité des enzymes antioxydants telle que : la catalase et le GPx et une diminution au niveau du taux de GSH est distinguée.

Les extraits butanoliques des plantes jouent un rôle chémoprotecteur vis-à-vis du stress oxydatif produit lors de l'administration de la DOX aux animaux de laboratoire. Car ils possèdent une activité antioxydant grâce à leurs pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène. Il ressort clairement de notre étude que les prétraitements par les extraits butanoliques des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* à des doses (50 et 100mg/kg) et la vitamine E à la dose (100mg/kg) tempore les niveaux des paramètres biochimiques et d'MDA. Ainsi, une normalisation des paramètres antioxydants tels que les enzymes antioxydantes (GPx et CAT) ou le GSH est rapporté.

Les résultats obtenus indiquent que les extraits butanoliques des deux plantes sont pourvus d'un pouvoir antiradicalaire et antioxydant pouvant jouer un rôle chémoprotecteur et préventif vis-à-vis la toxicité induite par la DOX.

Ces résultats sont confirmés par une étude histologique réalisé aux tissu hépatique et rénale des groupes traités par la DOX à la dose (10mg/kg) ou on observe des cellules nécrotiques, alors qu'aux niveaux des groupes prétraités par l'extrait butanolique de la plante *H. confertum* avec ses deux doses (50 et 100mg/kg) on examine une présence focale des hépatocytes clarifiées en début de nécrose.

En conclusion, les extraits des plantes *H. confertum* et *H. ruficomum* montrent une richesse en polyphénols avec un taux élevé des flavonoïdes. Ces composés phénoliques s'avèrent d'un pouvoir anti cancéreux et anti radicalaire important comparés à la vitamine C.

Les mots clé : *Helianthemum confertum* et *Helianthemum ruficomum*, stress oxydative, activités anti oxydants, Doxorubicine, extraits des plantes, peroxydation lipidique, composés phénoliques.