



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale **قسم :**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie et Santé

Intitulé :

**Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale
Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre
la toxicité de la**

Présenté et soutenu par : Haioun Amina

Le : 15 /06/2015

Hamoudi Fatima zohra

Jury d'évaluation :

Président du jury : Lalaoui Koureichi

Professeur à L'UFMC

Rapporteur : Ihoual Safia

Maitre Assistante à L'UFMC

Examineurs : Boubekri Nassima

Maitre conférence à L'UFMC

Examineurs : Boulkandoul Ramzi

Maitre Assistant à L'UFMC

*Année universitaire
2014 - 2015*

Partie bibliographique :

Chapitre I:Les radicaux libres

I.1.Définition.....	(1)
I.2. Principales sources des radicaux libres.....	(1)
I.2.1 Sources exogènes des ROS.....	(1)
I.2.2 sources endogènes des ROS.....	(2)
I.3 nature des radicaux libres.....	(3)
I.3.1 espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)	(5)

Chapitre II: Stress oxydatif

II.1.Définition.....	(8)
II.2.Stress oxydant et ces conséquences biologiques.....	(8)
II.2.1.Les lipides	(9)
a. L'initiation.....	(9)
b. La propagation.....	(9)
c. La terminaison.....	(10)
II.2.2.Les protéines.....	(10)
II.2.3.Les acides nucléiques.....	(10)
II.2.4.Système de défenses antioxydants.....	(11)
a. Antioxydants endogènes	(12)
b. Antioxydants d'origine végétal	(12)
b.1.Tocophérols.....	(12)
b.2.Caroténoïdes.....	(13)
b.3.Les polyphénols.....	(14)
b.3.1.Classification.....	(16)

b.3.2.Composés phénoliques.....	(17)
b.3.3.1.Définition.....	(17)
b.3.3.2.Les produits naturels des plantes et leurs activités biologique	(18)
-Les flavonoïdes.....	(18)
-Les tannins.....	(19)
-Les terpènes.....	(19)
-Les saponosides.....	(19)
-Les coumarines.....	(20)
-Les alcaloïdes.....	(20)
b.3.4.Les propriétés biologiques des polyphenols.....	(21)
b.3.5.Les flavonoïdes.....	(21)
b.3.5.1.Définition.....	(21)
b.3.5.2.Classification.....	(22)
-Les flavonoïdes hétérosides.....	(23)
-Les flavonoïdes aglycones.....	(23)
b.3.5.3.La biosynthèse des flavonoïdes.....	(23)
b.3.5.4. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des	
flavonoïdes	(24)
b.3.5.5.Activité antioxydante de flavonoïdes	(25)
b.3.5.5.1.Piégeage de radicaux libres.....	(25)
b.3.5.5.2.Chélation des ions métalliques.....	(26)
b.3.5.5.3.Inhibition enzymatique.....	(26)
b.3.6.Propriété des flavonoïdes.....	(27)
b.3.6.1.Propriété anti-inflammatoires des flavonoïdes	(27)
b.3.6.2.Propriété antivirales et antibactériennes.....	(27)
b.3.6.3.D'autres propriétés des flavonoïdes	(28)

Chapitre III: L'inflammation

III.1.Définition de l'inflammation	(29)
III.2.L'inflammation aigue.....	(29)
*Phase vasculaire.....	(30)
*Phase cellulaire.....	(30)
*Phase de résolution.....	(31)
III.3.L'inflammation chronique.....	(31)
III.4.Médiateurs solubles et cellulaires de l'inflammation.....	(32)
III.4.1.Médiateurs solubles.....	(33)
III.4.2.Médiateurs cellulaires de l'inflammation aigue.....	(33)
III.5.Anti-inflammatoire	(33)
III.5.1.Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	(33)
III.5.2.Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	(34)
III.5.3.Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	(36)

Chapitre IV: La plante médicinale anethum graveolens

IV.1.Définition	(37)
IV.2.Répartition géographique.....	(38)
IV.3.Description de la plante.....	(38)
IV.4.La classification phylogénétique.....	(38)
IV.5.Principaux constituants.....	(40)
IV.6.Propriété/indications.....	(40)
IV.7.Formes d'utilisation et dosage.....	(41)
IV.8.Utilisation en médecine traditionnelle.	(41)

Chapitre V: La cardiotoxicité par la doxorubicine

V.1.Introduction	(42)
V.2.Généralité sur la doxorubicine.....	(42)
V.3.Les raisons d'utiliser ce médicament.....	(42)
V.4.Les effets de ce médicament.....	(43)
V.5.Principales indications	(43)
V.6.Doxorubicine liposomale pégylée:(CAELYX®).....	(43)
V.7.Extravasation.....	(44)
V.8.Principaux mécanismes d'action de l'anthracyclines.....	(44)
-Transport nucléaire.....	(45)
-Intercalation.....	(46)
-Inhibition de la topo-isomérase II.....	(46)
-Les radicaux libres.....	(46)
-Appotose.....	(46)
V.9.Toxicité cardiaque des anthracyclines: doxorubicine.....	(46)
V.9.1.Physiopathologie.....	(46)
*Toxicité aigüe et troubles du rythme.....	(46)
*Toxicité retardée.....	(47)
V.9.2.Aspects biochimiques de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	(47)
V.9.2.1.Hypothèse radicalaire.....	(48)
a. Formation d'espèces activées de l'oxygène lors du métabolisme de DOX	(49)
aa. Formation d'espèces activées de l'azote par interactions entre les espèces radicalaires.....	(49)
aaa. Aspects toxiques cellulaires de la production d'espèces oxydantes par les	

anthracyclines.....	(50)
V.9.2.2.Hypothèse des métabolites toxiques issus des métabolismes des anthracyclines.....	(50)
V.9.2.3.Hypothèse liée au niveau de l'apoptose cellulaires induites par le DOX.....	(51)
V.9.3.Aspects histologiques.....	(51)
V.9.4.Facteurs de risques.....	(53)
V.9.5Aspect cliniques.....	(53)
V.9.6.Prévention.....	(54)
*Utilisation d'agent protecteur de la toxicité cardiaque.....	(54)
-Ex: chélateur de fer.....	(54)
V.9.7.Surveillance de la fonction cardiaque.....	(54)

Partie expérimentale :

***Matériels et méthodes**

I. Matériel	(55)
I.1.Matériel biologique(Echantillonnage)	(55)
I.1.1.Matériel végétal : « <i>Anethum graveolens</i> »	(55)
I.1.2.Réactifs chimiques et instrumentations	(55)
I.2.Matériel animal	(55)
I.2.1.Etude expérimentale	(55)
II. Méthodes	(56)
II.1. Préparation des extraits végétaux	(56)
II.1.1. Préparation d'extrait méthanolique.....	(56)
II.1.2. Préparation de l'extrait aqueux	(56)

II.2. Screening phytochimique de l'extrait végétale.....	(56)
II.2.1. Mise en évidence des tanins	(57)
II.2.2. Mise en évidence des saponosides.....	(57)
II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes	(57)
II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes.....	(57)
II.2.4. Mise en évidence des composés réducteurs	(57)
II.2.5. Mise en évidence des alcaloïdes	(57)
III. Dosage des flavonoïdes	(58)
IV. Dosage des polyphenols totaux	(58)
V. Activité Anti-inflammatoire	(58)
VI. Peroxydation des lipides.....	(59)
VII. Activité anti-oxydante	(60)
VII.1. Piégeage du radical hydroxyle	(60)
VII.2. DPPH (effet scavenger)	(60)
VII.3. Reducing power	(61)
VIII. Traitement des animaux	(61)
VIII.1. Les groupes des animaux	(62)
VIII.2. Prélèvement sanguin	(62)
VIII.3. Préparation de la fraction cytosolique de tissus 10%	(62)
IX. Evaluation du MDA et du GSH cardiaque	(62)
X. Dosage du glutathion réduit cardiaque	(63)

XI. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique	(64)
---	------

***Résultats et discussion**

I. Le rendement des extraits	(66)
------------------------------------	------

II. Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques	(66)
---	------

III. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	(68)
--	------

IV. Dosage des flavonoïdes	(68)
----------------------------------	------

V. Test <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	(72)
---	------

V.1. Balayage radical hydroxyle sur l'activité de l'extrait Méthanolique et aqueux...	(72)
---	------

V.2. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux et méthanolique par la méthode de DPPH (effet scavenger)	(73)
--	------

V.3. Réducing power	(76)
---------------------------	------

VI. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	(77)
---	------

VII. Peroxydation des lipides	(79)
-------------------------------------	------

VIII. Evaluation du MDA cardiaque.....	(81)
--	------

IX. Evaluation du GSH cardiaque.....	(82)
--------------------------------------	------

X. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique	(83)
--	------

Liste des abréviations :

EAO : espèces réactives de l'oxygène.

RL : radicaux libres.

ROS : reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène).

NADPH : nicotinamide adénine di nucléotide phosphate hydrogynase.

NADP : nicotinamide adénine di nucléotide phosphate.

O_2^- : l'anion superoxyde.

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène.

NO : Le monoxyde d'azote.

ONOO⁻ : le peroxydinitrite.

SOD : super oxyde dismutases.

H : hydrogène.

O_2 : oxygène.

Fe^{2+} : fer ferreux.

Fe^{+3} : ferric ion.

NO_2 : Nitrique dioxyde.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AGPI : acide gras poly insaturé.

MDA : malondialdehyde.

EOR : espèce réactive de l'oxygène.

GPx : La glutathion peroxydase.

GSH : glutathion réduit.

YALTA: Young Adult Longitudinal Trends in Antioxydants.

PKC: type de kinase.

PI3kinase: phosphite tri kinase.

LDL: Low Density Lipoprotein.

Cu⁺²: L'ion cuivrique.

iNOS: nitrique synthase inducteur.

COX: Cyclooxygénase.

HIV: human immunodeficiency virus.

UV: ultra violet.

IL8 : interleukine 8.

LTB4 : Leukotriene B4.

C3a : protéine 3 a du complément.

C5a : protéine 5a du complément.

PMNs : Polymorphonucléairesneutrophiles.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

PGE2 : prostaglandine E2.

PGI2 : prostaglandine I2.

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens.

GR : récepteurs des glucocorticoïdes.

LANL : leucémie aigue non lymphoblastique.

LAL : leucémie aigue lymphoblastique.

DOX : doxorubicine.

MDR : multi Drug résistance.

P53 : protéine facteur de transcription.

Bcl-XL: B cell lymphoma-extra large.

Apaf-1: apoptosis activating factor-1.

Bax: Bcl (B cell lymphoma).

TNF: tumor necrosis factor.

SOD: super oxyde dismutase.

GSHPx: glutathions peroxydases.

RS : réticulum sarcoplasmique.

DCT: discrete cosine transform.

JNCI : Journal de l'institut national américain du cancer.

HTA : hypertension artérielle.

ECG : électrocardiographie.

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche.

CAT: Catalase.

BHT: Butylhydroxytoluène.

BSA : albumine bovine serum.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

mg/g : milligramme par gramme.

g: gramme.

A : Absorption.

UV: Ultra-violet.

R : rendement.

% : pourcentage.

AGPI : Acide gras polyinsaturé.

EA : extrait aqueux.

EAAG : extrait aqueux *d'Anethium Graveolens*.

EMAG : extrait méthanolique *d'Anethium Graveolens*.

EQ : Equivalent de quercétine.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

SD : Standard deviation.

CI50 : Concentration inhibitrice à 50%.

Listes des figures :

Figure 01 : Formation des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.

Figure 02 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

Figure 03: Les conséquences du stress oxydant.

Figure 04 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants.

Figure 05 : Les différentes classes des composés phénoliques.

Figure 06 : Structure de base des flavonoïdes.

Figure 07: différentes classes de flavonoïdes.

Figure 08 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}).

Figure 09: La réponse inflammatoire.

Figure 10: Formation du transsudat et d'exsudat.

Figure 11 : Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.

Figure 12: mécanisme d'action des AINS.

Figure13 : Aspect morphologique de la plante *Anethum. G*

Figure 14: Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.

Figure 15: Mécanisme d'action des Anthracyclines: Intercalation dans l'ADN et stabilisation de l'enzyme "Topoisome II".

Figure 16: Production de radicaux super-oxydes par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines et formation de peroxy-nitries, issus de la production concomitante d' O_2 et de monoxyde d'azote (NO) par les anthracyclines.

Figure 17 : La formule chimique du la glutathion réduit.

Figure 18 : Courbes d'étalonnage de la quercétine.

Figure 19 : La quantité des flavonoïdes en mg EQ/g et en mg ER/g extrait.

Figure20 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point de la courbe représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

Figure 21 : Quantité des phénols totaux l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique d'acide galique.

Figure 22 : Piégeage du radical hydroxyle des extrait aqueux, méthanolique et Vc.

Figure 23 : Pourcentage de pouvoir réducteur d'extrait aqueux, méthanolique et Vc.

Figure 24 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Figure 25 : pourcentage d'inhibition de BHT.

Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait méthanolique d'AG 1%.

Figure 27 : La concentration des deux extraits et de BHT qui inhibent 50 % du radical DPPH
Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD radical DPPH Les valeurs
représentent la moyenne des deux essais \pm SD.

Figure 28 : Principaux éléments de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.

Figure 29 : Pourcentage de pouvoir réducteur d'extrait aqueux, méthanolique et Vc

Figure 30: Pourcentage d'inhibition de l'EAAG et EMAG du test lipide peroxydase
d'homogénat

Figure 31: Pourcentage d'inhibition de l'EAAG et EMAG du test peroxydation lipidique du
Jaune d'œuf

Figure 32: Evaluation du MDA cardiaque dans l'extrait méthanolique par rapport au
DOX

Figure 33: Evaluation du GSH cardiaque dans l'extrait méthanolique par rapport au
DOX

Figure 34: Dosage de l'activité de la catalase cytosolyque dans l'extrait méthanolique par
rapport au DOX.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Les principales espèces réactives de l'oxygène.

Tableau 02 : Quelques activités biologiques des polyphénols.

Tableau 03: Principales classes de composés phénoliques.

Tableau 04: Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.

Tableau 05: Classification du score biopsique de gravité en fonction des lésions histologiques observées par BEM.

Tableau 06 : Le rendement d'extraits aqueux et méthanolique de la plante.

Tableau 07 : Analyse phytochimique préliminaire d'extrait aqueux d'*Anethum graveolens*.

Tableau 08: Les concentrations des composés phénoliques qui inhibent 50 % du radical DPPH.

Tableau 09 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à la concentration De 250 $\mu\text{g/ml}$.

Introduction Générale :

L'utilisation des plantes médicinales par l'homme est une pratique antique (149). Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation. Et comme des anti-inflammatoires, et des anti-analgésiques(149).

Ce travail vise à étudier l'activité anti-inflammatoire et antioxydante de l'extrait brut et méthanolique de la plante aromatique et médicinale algérienne *Anethum Gravéolens*. Qui appartient à la famille des **apiaceae (150)**. Elle est parmi la famille de plantes la plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicinale intéressante.

La sélection de cette plantes est fondée sur les critères suivants : sont parmi les plus populaires plantes aromatique et médicinales utilisées dans le monde entier, leur utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, à coté du fait que leur huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique, leur efficacité dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement, elles représentent récemment un sujet de recherche scientifique intéressant.

Les anthracyclines sont à la base de très nombreux protocoles de chimiothérapie, pour les pathologies malignes. Leur utilisation est cependant souvent limitée par leur toxicité, la cardiotoxicité étant leur effet indésirable irréversible le plus important, qui se manifeste à partir d'une dose de 500 mg/mk d'équivalent Doxorubicine sous forme d'insuffisance cardiaque chez 5% des patients. Des doses cumulées supérieures donnent une augmentation rapide de l'incidence de l'insuffisance cardiaque, avec morbidité et mortalité accrues (151). Le doxorubicine est un agent anticancéreux, agirait entre autres en s'intercalant entre les bases d'Acide désoxyribonucléique (ADN), en inhibant la topoisomérase II et en causant la production de stress oxydatif (151).

Notre but est comment diminuer la toxicité des espèces réactive de l'oxygène qui est formé pendant et après le traitement du doxorubicine, par l'utilisation de la plante médicinale *Anethume Graveolens*.

Chapitre I : les radicaux libres:

I.1.Définition:

Un radicale libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (EAO) (1).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques indépendantes. En toxicologie, les radicaux libres sont ceux qui existent dans un état libre et capables d'interagir avec différents composés de tissus.

Un groupe de termes est utilisé dans la littérature scientifique pour désigner les radicaux libres:

Oxyradicaux, radicaux libres de l'oxygène (2) et oxydants en raison de leur haute réactivité qui leur permet de gagner un électron à partir d'autres composés en causant leur oxydation (3) ainsi que d'autres nominations. L'existence des RL primaires qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron, et d'autres radicaux secondaires formés par la réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule, ainsi que des espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène et douées d'une réactivité semblable impose la notion des espèces réactives de l'oxygène *ROS* pour désigner l'ensemble des entités contenant un ou plus d'atomes d'oxygène qui leur confère un critère défini d'être chimiquement réactif (4).

I.2. Principales sources des radicaux libres:

Les radicaux libres sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. On parle donc de deux sources endogènes et exogènes (5).

I.2.1.sources exogènes des ROS:

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (6).

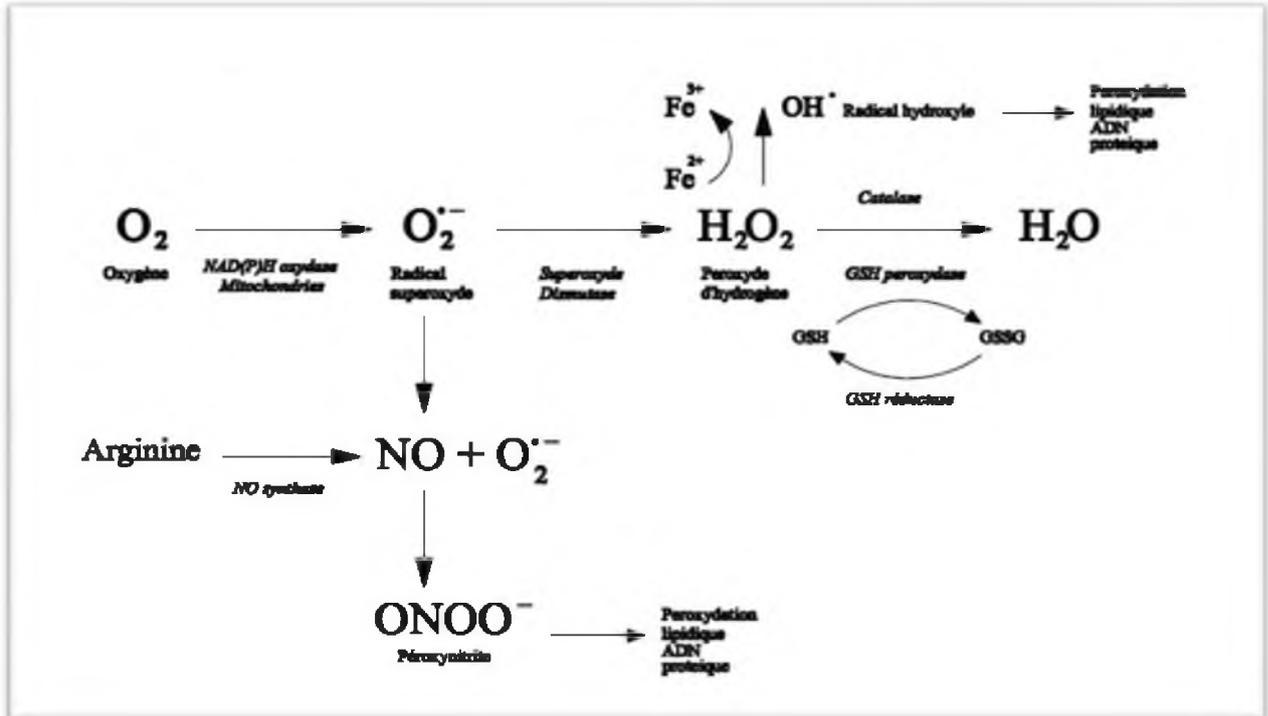


Figure 01 : Formation des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqué en biologie (7).

I.2.2 Sources endogènes des ROS:

Les systèmes biologiques les plus simples générant des ROS sont les constituants cellulaires solubles capables d’activer l’oxygène moléculaire lors des réactions d’auto-oxydation. Ce groupe comprend, parmi d’autres, des thiols, des hydroquinones, des flavines, des catécholamines, des tetrahydropterines, des hémoprotéines, et des métaux de transition (8). Mais la production des ROS dans les cellules mammifères est essentiellement d’origine enzymatique et découle dans plusieurs sources possibles (Figure1). Il s’agit principalement de :

· NAD(P) H oxydase qui est une enzyme membranaire (9) NAD(P) H comme substrat et génère $O_2^{\bullet-}$ (10) selon la réaction suivante :



· La xanthine oxydase/déshydrogénase peut générer $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 en utilisant la xanthine ou l’hypo xanthine et NADH comme substrat (10) ·



Enzymes de la voie de l'acide arachidonique, les lipoxygénases synthétisant les leucotriènes et les Cyclo-oxygénases synthétisant les prostaglandines et les thromboxanes.

· Enzymes des organites cellulaires comme les enzymes mitochondriales constituant la source principale des ROS, la myéloperoxydase lysosomiale, les cytochromes P450 du réticulum endoplasmique lisse, les cytochromes oxydases et la chaîne de transport d'électron nucléaires, et les enzymes des peroxysomes comme la glycolate oxydase et D-aminoacides oxydases... etc.

I.3.Nature des radicaux libres:

Tableau N 1 : Les principales espèces réactives de l'oxygène

Espèces réactives	Réaction de formation	Propriétés
L'Anion Superoxyde (O₂^{-•})	Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène: addition d'un seul électron. $O_2 + 1 e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO
Le Peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂)	Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysé par la <i>superoxyde dismutase</i> . $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD, 2 H^+} H_2O_2 + O_2$	La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (OH [•])
Le Radical Hydroxyle (OH[•])	formé par la réaction de <i>Fenton</i> à partir d'H ₂ O ₂ en présence de métaux de transition: L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + \cdot OH$	Le radical hydroxyle (•OH) est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme
Le Monoxyde d'Azote (NO)	Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O ₂) d'autre part en présence de cofacteur: NADH,H ⁺ , réaction catalysé par les NO synthase (Nos)	Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques (agit sur le tonus vasculaire)
Le Peroxynitrite (ONOO⁻)	En l'absence d'une quantité suffisante de cofacteurs ou de substrat (arginine), les NOS produisent de l'anion superoxyde (O ₂ ^{-•}) plutôt que du NO [•] . L'O ₂ ^{-•} produit lie le NO [•] pour former du <i>Peroxynitrite</i>	Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant, Il engendre des oxydations irréversibles et de nitration diverse (surtouts des résidus tyrosines)

La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet, deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons, mais ses capacités oxydantes sont limitées par une barrière cinétique importante. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical super oxyde O₂^{•-} qui est un radical modérément réactif (11).

L'anion super oxyde, $O_2^{\bullet -}$, est un mono anion radical avec un électron célibataire. Il est plus instable et plus réactif que la molécule d'oxygène car il possède trois électrons sur des orbitales antis liantes du fait que l'électron supplémentaire se place dans une orbitale anti liante.

L'anion peroxyde, $O_2^{\bullet -}$ n'est pas un radical. Cependant il est très instable du fait de l'existence d'un quatrième électron dans une orbitale anti liante. Dans l'eau, l'anion peroxyde $O_2^{\bullet -}$ se transforme en peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée, H_2O_2 ou HO_2H , par acceptation de deux protons. L'eau oxygénée joue un rôle très important dans les réactions radicalaires car elle peut donner des radicaux HO^{\bullet} .

L'anion super oxyde est le substrat d'enzymes essentielles, les super oxyde dismutases (SOD), qui le transforment en eau oxygénée H_2O_2 . L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, en particulier de fer Fe^{+2} , elle est transformée en radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ par la réaction de Fenton. Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres **(12,13)**.

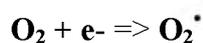
Les radicaux libres peuvent être produits par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant de l' O_2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des radicaux libres. C'est ainsi que la chaîne respiratoire provoque une libération importante des radicaux libres, mais dont l'intensité demeure controversée.

D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des radicaux libres, 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 des radicaux libres. **(14)**.

I.3.1. espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO):

Le radical anion super oxyde $O_2^{\bullet -}$:

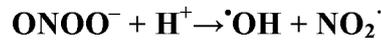
Est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire **(14)**. La principale source est l'explosion oxydative des cellules phagocytaires entrées en contact avec des antigènes ou des immun-complexes Les cellules phagocytaires connues pour produire le radical super oxyde sont les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les monocytes et les macrophages .



L'anion super oxyde $O_2^{\bullet -}$ joue un rôle très important dans la génération de d'autre radicaux

libres tels que Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, et l'oxygène singulet $\text{O}_2\cdot$ (15).

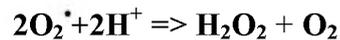
L'anion super oxyde capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxyde nitrite (ONOO^-) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique (16).



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :

Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical. A pH physiologique, tout ion peroxyde formé va se protoner pour donner immédiatement du peroxyde d'hydrogène.

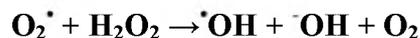
Au bilan, le peroxyde d'hydrogène est produit à partir du radical super oxyde en solution aqueuse. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène et du dioxygène (17). Cette réaction est catalysée par le super oxyde dismutase.



Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les produits qui lui donnent naissance, ainsi sa réactivité est moins importante. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et ainsi de diffuser très facilement d'où une possibilité d'action à distance (16). Malgré une réactivité moins importante, le peroxyde d'hydrogène est un oxydant très puissant. Grâce à la myélo peroxydase des polynucléaires neutrophiles, le peroxyde d'hydrogène est couplé à un ion chlorure pour donner l'hypochlorite, un agent bactéricide (18) et (15).

Le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$:

Est le radical le plus dangereux dans l'organisme, il est formé de la réaction de l'anion super oxyde avec l'hydrogène peroxyde



Ainsi la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène donne deux radicaux hydroxyles. Cette fission peut être causée par la chaleur ou par des radiations ionisantes. Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyles. Cette réaction fut observée pour la première fois par Fenton en 1894 (17) (12).



Le radical Hydroxyle réagit avec les lipides, polypeptides, protéines, et ADN, spécifiquement la thiamine et la guanosine (19).

Oxyde nitrique :

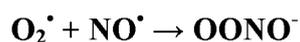
Est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (20). L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa surproduction dans des conditions spécifiques capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tels que l'acide ascorbique et l'acide urique et capable d'entamer la lipide peroxydation (21).

Nitrique dioxyde NO₂ :

Formé à partir de la réaction du radical peroxyde avec NO[•] Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur de la lipide peroxydation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés.

Peroxynitrite :

La réaction du NO avec l'anion super oxyde donne naissance au peroxynitrite (21).



Le Peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique qui provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL (16).

Peroxynitrite apparaît comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératifs et des lésions rénales.

Le peroxynitrite (OONO⁻) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotées des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (22).

Chapitre II: Stress oxydatif:

II.1.Définition:

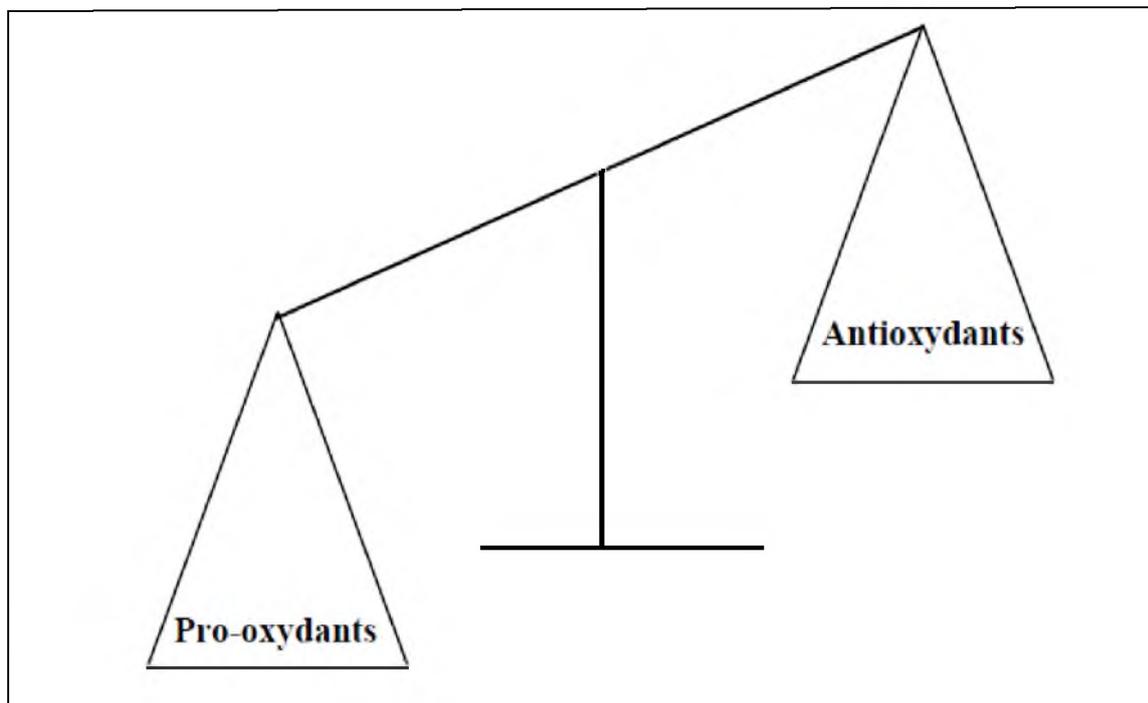


Figure 02 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'ERO, en faveur de ces dernières (Figure 2).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (23).

Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique.

II.2.Stress oxydatif et ces conséquences biologiques:

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses anti oxydantes, que ce soit

par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses anti oxydantes (24).

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.

L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique.

II.2.1. Les lipides:

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence des doubles liaisons, comme par exemple l'acide linoléique. L'origine des réactions radicalaires sont assurés par peroxydation lipidique qui se traduit par le rancissement *in vitro*. Il se trouve trois différentes étapes pour le mécanisme de la réaction radicalaire sera complet se sont: l'initiation, la propagation et finalement la terminaison (25).

a .L'initiation:

L'attaque par un radical OH^\cdot du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné \mathbf{R}^\cdot . (OH^\cdot) enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxyde RO_2^\cdot (26).

b. La propagation:

Le radical RO_2^\cdot enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical \mathbf{R}^\cdot , puis un radical RO_2^\cdot , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydro peroxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décomposition ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynéoal représentant les produits les plus toxique de la peroxydation lipidique (26,27).

c. La terminaison:

Cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite "briseur de chaîne" (28).

II.2.2. Les protéines:

Au cours du stress oxydant, les protéines subissent des modifications soit en présence de métaux de transition, soit se l'action des radicaux libres (29). La formation de groupement carbonyles résulte lorsque les radicaux libres réagissent avec le groupement radical des acides aminés.

Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* que *in vitro* (30,31).

II.2.3. Les acides nucléiques:

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées, (32). Les ERO ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (27).

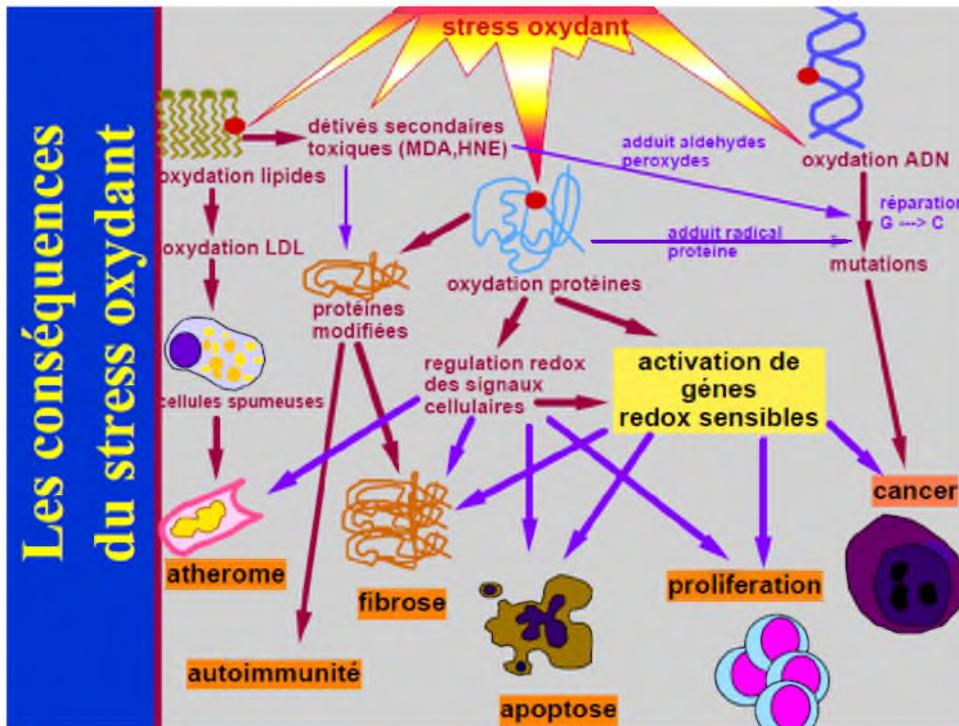


Figure 03: Les conséquences du stress oxydant

II.2.4. Système de défenses antioxydants:

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelés antioxydants (33). Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autre substrat oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation des ces substrats (34, 35,36).

L'organisme est déterminé d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydants dans l'organisme. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (figure 5). (37, 35, 36,38).

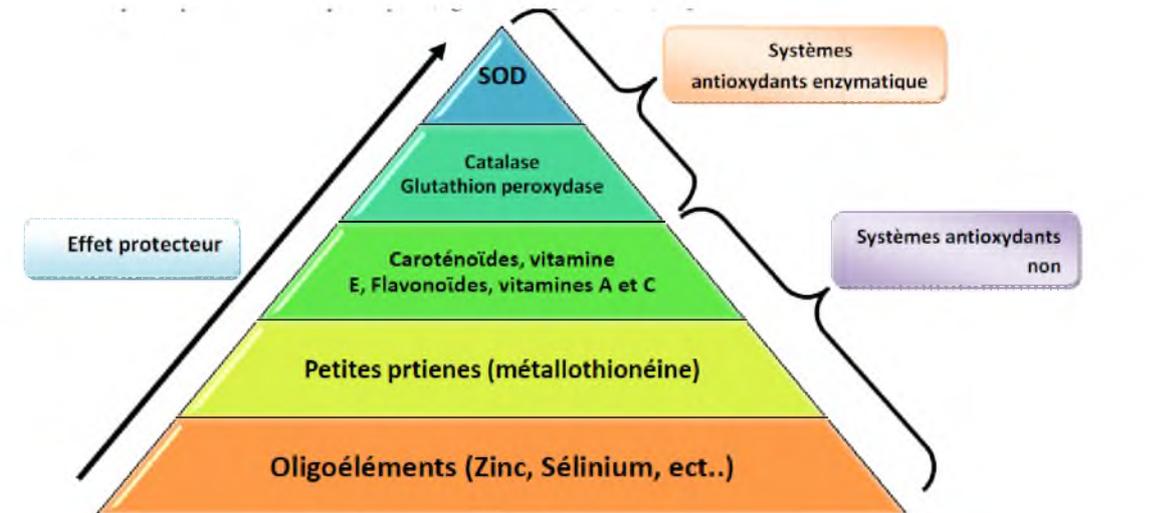


Figure 04 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants

a. Antioxydants endogènes:

Les défenses anti oxydantes de l'organisme peuvent se diviser en système antioxydants enzymatiques.

Un système de défense primaire: composé d'enzymes et de substances anti oxydantes

-La super oxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion super oxyde O_2^- .

-La glutathion peroxydase (GPx) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.

-Les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, biquinone,...etc.

Un système de défense secondaire: composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonucléase et ligase, des macroxyprotéinases.

b. Antioxydants d'origine végétal:

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont: les tocophérols, les caroténoïdes et polyphénols. (39).

b.1.Tocophérols :

La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la

présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques: alfa, bêta, sigma et gamma, Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI. (39).

Exemple de tocophérol:

La vitamine E:

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central).

La forme alfa tocophérol est la plus active parmi les autres formes de cette vitamine (40). Elle se fixe les radicaux libres organiques qui peuvent provenir de l'oxydation des lipides et participe à diminuer la propagation des réactions de peroxydation lipidique (36, 41).

La vitamine E peut mettre fin à une réaction radicalaire en chargeant du radical.

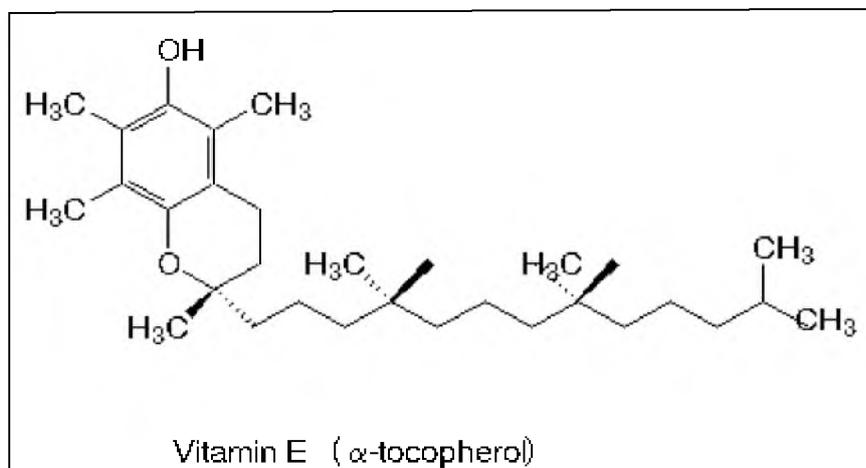


Figure 05 : Structure chimique de la vitamine E

b.2.Caroténoïdes:

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. De façon formelle, tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire (C₄₀H₅₆) avec de nombreuses doubles liaisons, le lycopène, pigment rouge présent notamment dans la tomate et le pamplemousse. 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. Le β -carotène se retrouve dans l'abricot, le melon, la carotte, les légumes verts (épinards, laitue...) : l'apport journalier recommandé est de 1 à 5 mg.

Plusieurs études, dont l'étude YALTA (Young Adult Longitudinal Trends in Antioxydants), ont montré que l'effet bénéfique du β -carotène ne survenait qu'à des doses physiologiques ou alimentaires, alors qu'il est plutôt délétère à doses pharmacologiques, particulièrement chez le fumeur (42). Le tabagisme expose à des taux élevés d'EOA endogènes et exogènes et pourrait altérer le métabolisme de certains caroténoïdes, libérant des métabolites pro-carcinogènes.

b.3. Les polyphénols:

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épi catéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre.

Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins (Figure 06). En plus de leur activité antioxydante, ils sont doués de plusieurs autres activités biologiques importantes (Tableau 1).

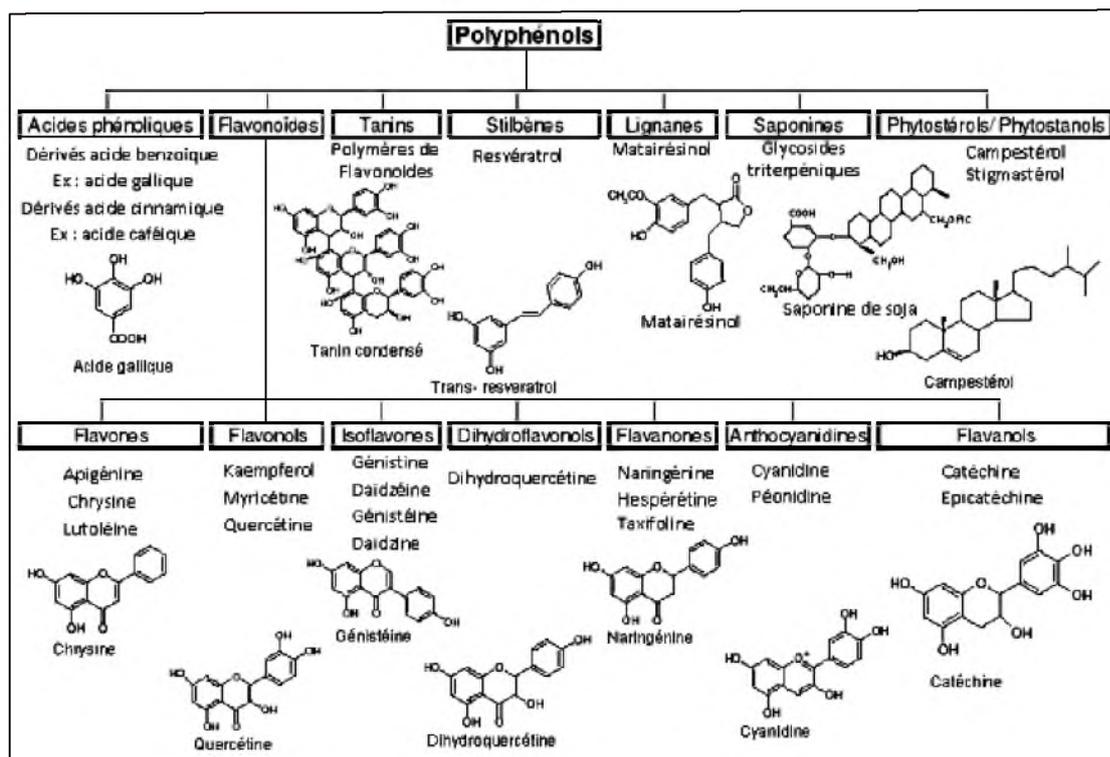


Figure 06 : Les différentes classes des composés phénoliques (43)

Tableau 2 : Quelques activités biologiques des polyphénols.

<i>Polyphénols</i>	<i>Activités</i>	<i>Auteurs</i>
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes	Didry et al., 1982 Ravn et al., 1984 Hayase et Kato., 1984
Coumarines	Protectrices vasculaires et Antioedémateuses	Mabry et Ulubelen., 1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes antivirales, anti-allergiques	Stavric et Matula., 1992 Das et al., 1994 Bidet et al., 1987 Bruneton ., 1993 Aruoma et al., 1995 Middleton et Kardasnam., 1993.
Anthocyanes	Protectrices veineux	capillaro- Bruneton., 1993
Proanthocyanidines	Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	Bahorun., 1997 De Oliveira et al., 1972 Brownlee et al., 1992 Kreofsky et al., 1992
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes Antimicrobien	Okuda et al., 1983 Okamura et al., 1993 Milal et al., 1996.

b.3.1.Classification:

Une classification de ces substances a été proposée par HARBORNE en 1980 (**Tableau 2**) (44).

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Deux principales classes sont largement répandues :

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines

Plus rares, les coumarines, les stilbènes ne seront pas décrit en détail ici.

Tableau 3: Principales classes de composés phénoliques (45)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Coumarines	Myristicin, eugénol	
	Isocoumarines	Scopolétine	
	Chromones	Myristicine, eugénol	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Eugenine	
		Juglone, plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
	Anthraquinones	Anthraquinones	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Neolignanes	Eusiderine	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Amentoflavone	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		

b.3.2. Composés phénoliques:

b.3.3.1. Définition:

Les composants phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois); et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des graines et la maturation des fruits.

Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide férulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines. Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils

sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires, antimicrobiens (46).

b.3.3.2. Les produits naturels des plantes et leurs activités biologiques:

Les plantes produisent un grand nombre de composés, Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires (47).

***Les métabolites primaires :** ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal, se retrouvent dans toutes les espèces.

***Les métabolites secondaires:** ils ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures (47). Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques, microorganismes pathogènes... etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre. Ils sont différentes espèces (48). Parmi eux : les terpènes, les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes et les coumarines (47).

-Les flavonoïdes:

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (49).

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C6-C3-C6), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (50).

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone (51) à 15 atomes de carbone (C6-C3-C), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C6 (52), portant des les anthocyanes fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (51).

Parmi les flavonoïdes on a : les flavones, les flavonoles, les isoflavones et les anthocyanes.

-Les tannins:

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leurs structures chimiques sont en effet variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes. De ce fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire. Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés.

-Tanins hydrolysables : ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

-Tanins condensés : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leuco anthocyanidines). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides (53).

-Les terpènes:

Les terpènes forment un groupe de produits largement représenté, Ils sont formés par la polymérisation des unités à 5 atomes de carbone. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles.

Des études faites sur des animaux ont montré que certaines classes des terpènes telle que : le bêta sitostérol, comme son glucoside, possèdent des propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique et immuno-modulatrice (47). Aussi, les terpènes sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (saveur, conservateur) et l'industrie du parfum (54).

-Les saponosides:

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique).

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés

sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, Immunoadjuvante, cytotoxique, anti tumorale et hypocholestérolémiant (55). Les chaînes oligosaccharidiques greffées sur l'aglycone sont soit linéaires, soit branchées et peuvent renfermer jusqu'à 11 monosaccharides.

La partie osidique est le plus souvent inactive, tout en exerçant un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption, voire son transport vers tel ou tel organe. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie. La partie sucre et l'aglycone sont normalement liées par une fonction éther ou ester.

-Les coumarines:

Ce sont des dérivés de la benzo alfa-pyrone. La coumarine proprement dite, a été isolée en 1820, pour la première fois de la fève Tinka, *Coumarona adorata* (Légumineuse). C'est la lactone de l'acide o-hydroxy-cinnamique. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, super oxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (56).

-Les alcaloïdes:

Les alcaloïdes constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales (57). Leur extrême importance tient d'une part à leur activité et d'autre part à leur toxicité. Le terme d'alcaloïdes a été introduit en 1818 par W. Meissner ; il rappelle le caractère alcalin de ces substances, mettant à profit leur extraction et leur dosage.

Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale. La présence d'azote confère à la molécule un caractère basique plus ou moins prononcé, de distribution restreinte et douée d'activité biologique, à faibles doses. Ils sont de poids moléculaires extrêmement variables et certains peuvent atteindre un poids de 1000 g/mol.

Les alcaloïdes existent sous forme de sels (malates, méconates, isobutyrate, ...) et sous forme d'une combinaison avec les tanins. (47) On distingue trois classes d'alcaloïdes :

- Alcaloïdes vrais Ils sont issus seulement du règne végétal, ils existent à l'état de sels et sont bio synthétiquement formés à partir des acides aminés.

b.3.4. Les propriétés biologiques des poly phénols:

Les scientifiques recherchent activement aujourd'hui les raisons médicales qui sous-tendent les observations faites par les épidémiologistes au sujet du « French Paradoxe » (58). Leur découverte et les mécanismes qui les sous-tendent sont des enjeux considérables pour la santé de demain. Par leur extrême réactivité, les radicaux libres sont responsables de nombreuses

Pathologies et la capacité des composés poly phénoliques à assurer une protection efficace contre ces espèces délétères a été maintes fois proposée comme une des meilleures explications scientifiques des observations faites par les épidémiologistes.

Depuis une dizaine d'années, les travaux tentant d'élucider les mécanismes biologiques mis en jeu dans différentes pathologies et l'action de polyphénols sur ces dernières n'ont cessé d'augmenter.

b.3.5. Les flavonoïdes:

b.3.5.1. Définition:

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ de la carbone organique photo synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, sont convertis en flavonoïdes (59). Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure 7).

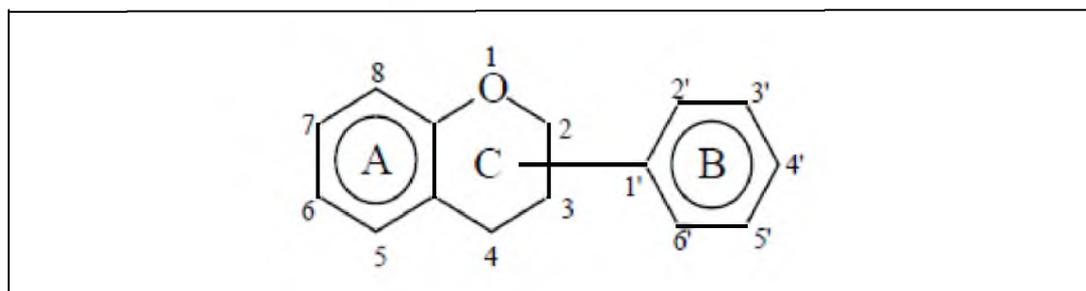


Figure 07 : Structure de base des flavonoïdes.

C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Ils sont de façon très générale localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophile), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) (60).

b.3.5.2. Classification:

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (figure 8), nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (61).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituant sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'oxydations (59).

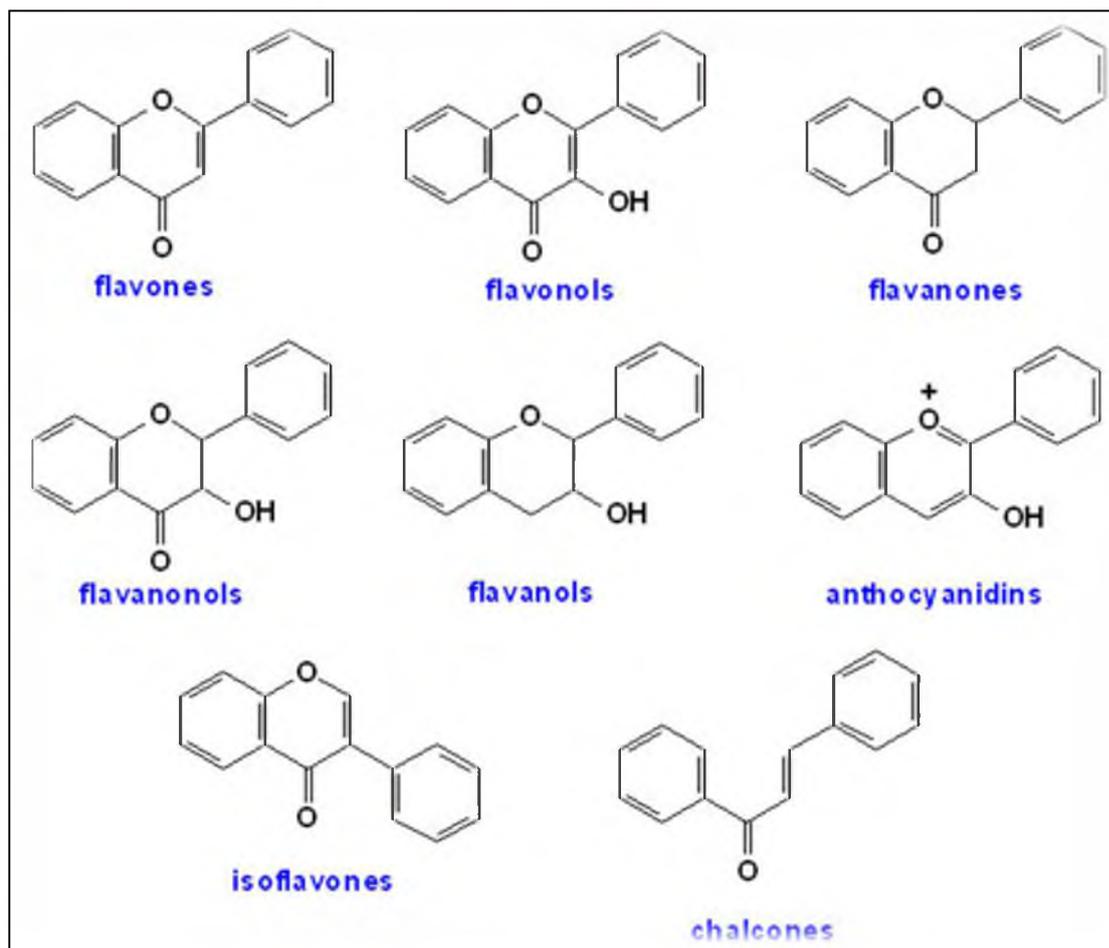


Figure 08: différentes classes de flavonoïdes

Flavonoïdes hétérosides : la partie osidique peut être mono, di ou tri saccharidique. En général, les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools, bon nombre d'entre eux ont une hydro solubilité plutôt faible (rutoside, hespéroside).

Les flavonoïdes aglycones : Les génines sont, pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. Les lipophiles des tissus superficiels des feuilles (ou des frondes) sont directement extraits par des solvants moyennement polaires (dichlorométhane) ; il faut ensuite les séparer des cires et des graisses extraites simultanément (on peut certes laver d'abord à l'hexane, mais la sélectivité de ce solvant n'est pas absolue) (62).

b.3.5.3. La biosynthèse des flavonoïdes:

Comme ça a été précisé auparavant, les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15

atomes de carbone. Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3, on parle alors de chalcones. Ces dernières représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes (63, 64,65).

La chalcone est métabolisée sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)- flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R)-dihydrokaempférol respectivement.

Les deux enzymes citées fonctionnent différemment : la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C3. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4- réductase, se métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3,4-diol et leucoanthocyanidol respectivement (66,67).

b.3.5.4. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont largement connus par leurs activités antivirales, antispasmodiques, anti tumorales, anti agrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, anti-hypertensives et antimicrobiennes (68, 69, 70, 71,72).

Certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein et de la prostate, comme elles préviennent aussi l'ostéoporose (73).

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2 (74). Certaines kinases (PKC, la PI3kinase et tyrosine kinases) impliquées dans la réponse inflammatoire sont aussi affectées par les flavonoïdes (75). La présence de la double liaison C2=C3 dans le noyau des flavonoïdes semble être essentielle à leur activité anti-inflammatoire (76). Le potentiel anti-inflammatoire dépend également du profile d'hydroxylation des cycles A et B (76). Les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'aldose réductase. En effet, (77) ont rapporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques. En plus, les flavonoïdes ont une activité antioxydants. En effet, ils peuvent agir de différentes

façons dans les processus de régulation du stress oxydant: par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ROS comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (78,79).

Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (80).

Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein). Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue, à la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que l'alfa-tocophérol et le ²-carotène (80).

b.3.5.5. Activité anti oxydante de flavonoïdes:

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés anti oxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à leur capacité de piéger directement les RL, de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss, d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, d'activer les enzymes anti oxydantes et de réduire les radicaux alfa-tocophérol (81, 82,83).

b.3.5.5.1. Piégeage de radicaux libres:

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les super oxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène (84).

Les radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations, d'initiations et de cancérisation ainsi que de dégradations cellulaires liées à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections : cancers, Inflammations chroniques, athéroscléroses...

Ainsi, leur propriété de piègeurs de radicaux implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires et, de ce

fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses (85). De ce fait, ils sembleraient également intervenir dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et maladies cardio-vasculaires.

b.3.5.5.2. Chélation des ions métalliques:

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{+2} est un stimulateur de la peroxydation des LDL (86).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (87)

La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.

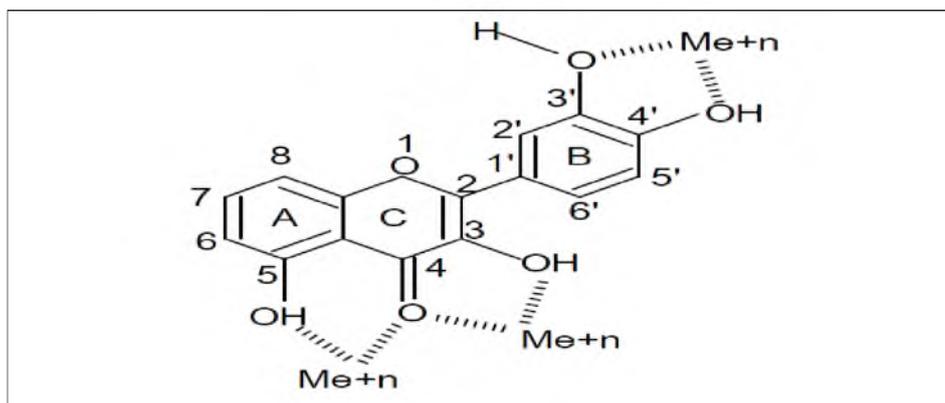


Figure 09 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}) (87)

b.3.5.5.3. Inhibition enzymatique:

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices de l' O_2 . Et d'autre EOR, la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipooxygénase,

mono oxygénase microsomal, et la glutathion S-Transférase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (84,88).

b.3.6.Propriété des flavonoïdes:

b.3.6.1.Propriété anti-inflammatoires des flavonoïdes:

Une inflammation par définition est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression (infection, brûlure, allergie...) qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur qui semble pulser ... (89).

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS) (90), bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs (91), car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion super oxyde conduisant à la formation de peroxy-nitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer (92).

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (93) d'autres sont capables d'inhiber l'histamine (71).

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (94).

b.3.6.2.propriété antivirales et antibactériennes:

-Propriétés antivirales :

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- Au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte
- Au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte
- Au niveau la de réplication du virus et la synthèse des protéines virales

-Au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 intégrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (95). Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (94).

-Propriétés antibactériennes :

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire. Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrase) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (95).

b.3.6.3.D'autres propriétés des flavonoïdes:

-Protection des plantes contre les radiations UV

-Sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.

-Agissent comme des pigments ou des Co-pigments

-Modulation de la distribution d'auxine

-Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire

-Régulation de l'élongation des tiges

-Interviennent dans la maturité des fruits

-Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (97,98,99).

Chapitre III: L'inflammation:

III.1.Définition de l'inflammation:

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (figure 10). L'inflammation est un processus habituellement bénéfique :

Son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire (100).

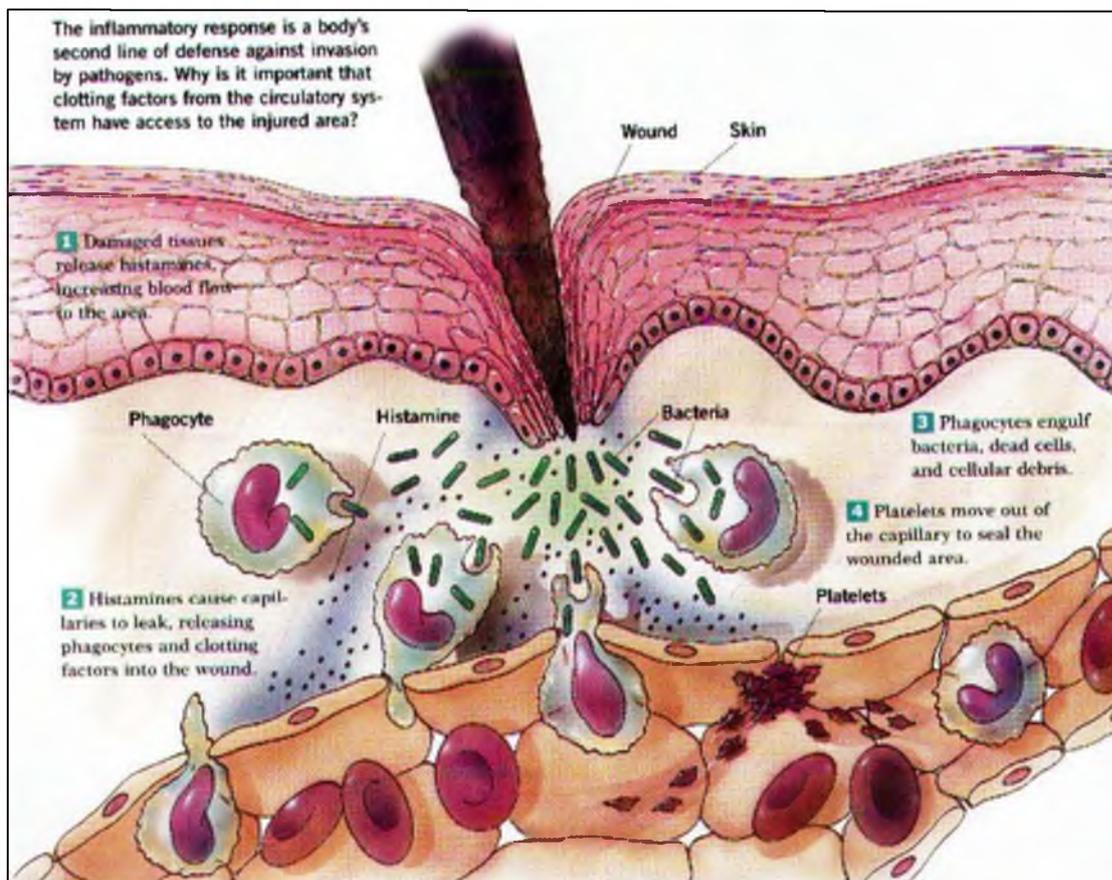


Figure 10: La réponse inflammatoire.

III.2.L'inflammation aigue:

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à

quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (100). L'inflammation aigue se constitue en trois phases :

***Phase vasculaire:**

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux. Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse) (Figure 11). Ce qui explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème (figure 11).

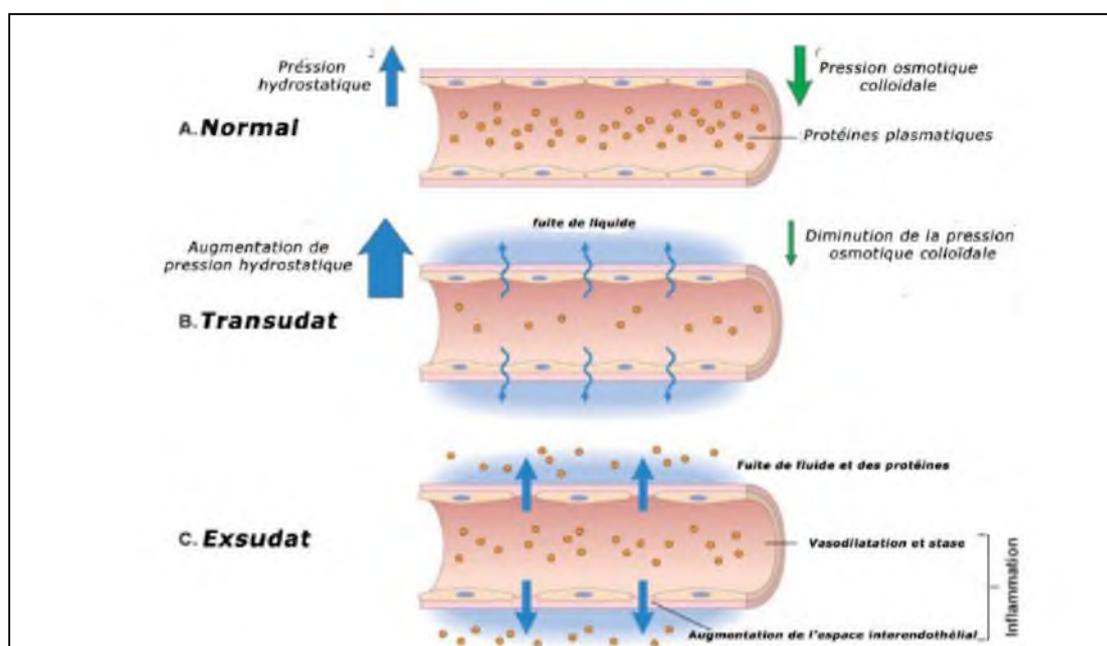


Figure 11: Formation du transsudat et d'exsudat (101).

***Phase cellulaire (recrutement des leucocytes):**

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction

d'assurer la détersion grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (102).

L'afflux des cellules, fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression en environ 30 minutes. C'est à ce moment qu'on pourra constater « in situ » la présence de, polynucléaires neutrophiles, lesquelles sont plaqués le long des cellules endothéliales de l'endroit concerné. Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8, C5a et LTB4. Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction n'est pas simple. Elle repose sur la dégranulation des composants internes de la cellule. Ceci conduit à la sécrétion des protéases (élastase et collagénase), et la libération des radicaux libres. Les PMNs vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme par exemple). Dans ce type de situation, la réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages dont le pouvoir phagocytaire est important, vont intervenir. Ceci constitue le passage de la réaction inflammatoire proprement dite à la réaction immunitaire et la mise en place des processus inhérents (100).

***Phase de résolution:**

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaire sont phagocytés par les macrophages.

Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (103).

III.3.L'inflammation chronique:

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire

chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la béryllose, et dans l'inflammation granulomateuse. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (100). Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorise l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire. En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (104,100).

III.4.Médiateurs solubles et cellulaires de l'inflammation:

III.4.1.Médiateurs solubles:

Certains de ces médiateurs existent sous forme inactive, avant toute lésion tissulaire, cette dernière ne faisant qu'activer ces molécules; d'autres sont synthétisés ou libérés à partir de différentes populations cellulaires. Leurs actions sont multiples, souvent redondantes et intègrent les voies de la coagulation, de l'immunité innée, de l'hématopoïèse et du système nerveux (101,100).

Les protéases plasmatiques comprennent le complément (activation par la voie classique ou par la voie alterne en fonction des stimuli, produisant des fragments chémoattractants tels que le C3a et le C5a), les kinines dont la cascade est initiée par différentes lésions tissulaires exposant du collagène ou des membranes basales et permettent d'activer le facteur XII, enfin des facteurs protéiques de coagulation et de fibrinolyse activant également le facteur XII qui génère de la plasmine, elle-même responsable de la production de médiateurs inflammatoires (100). Le tableau 1 résume l'origine et les effets des plus importants médiateurs chimiques de l'inflammation (100).

III.4.2.Médiateurs cellulaires de l'inflammation aigue:

Plusieurs types cellulaires interviennent dans la réaction inflammatoire. Les cellules les plus importantes sont les PMNs qui sont attirés au niveau des lésions tissulaires par la présence des médiateurs précoces de l'inflammation (leucotriènes, C5a). Cette attraction nécessite au préalable des interactions entre les cellules endothéliales et les neutrophiles qui, en plusieurs étapes, établissent des contacts grâce à des molécules d'adhésion (CD62L, CD11, CD18) qui se lient à des protéines membranaires des cellules endothéliales **(101)**. Dans le site inflammatoire, ces polynucléaires neutrophiles s'activent et dégranulent, en réponse à différents médiateurs solubles déjà évoqués (C5a, leucotriènes, facteurs d'activation des plaquettes, histamine), augmentent leur production d'enzymes oxydatives et leur capacité à phagocytose sous l'effet des leucotriènes, de facteurs de croissance hémopoïétiques tels que le G-CSF et le GM-CSF, du TNF et de l'Interleukine 8 **(100)**. D'autres cellules sont attirées sur le site de l'inflammation et participent à la constitution de l'infiltrat inflammatoire : les monocytes migrent et deviennent des macrophages activés capables de phagocytose, de production de protéines antibactériennes et de médiateurs pro-inflammatoires **(101)**.

Les éosinophiles sont également recrutés au site de l'inflammation aiguë, en particulier lorsque celle-ci est le fait d'une réaction allergique respiratoire, gastro-intestinale ou cutanée. Les plaquettes contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs incluant le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine. Enfin, les lymphocytes B et T produisent les cytokines pro-inflammatoires, initient la réponse immunitaire adaptative et contribuent à l'activation des PMNs par la production d'immunoglobulines par les B-lymphocytes **(101,100)**.

III.5.Anti-inflammatoire:

III.5.1.Anti-inflammatoires non stéroïdiens:

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes **thérapeutiques** les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial.

Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclo-oxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des

prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (Figure 12). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines (105). Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypo perfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (106).

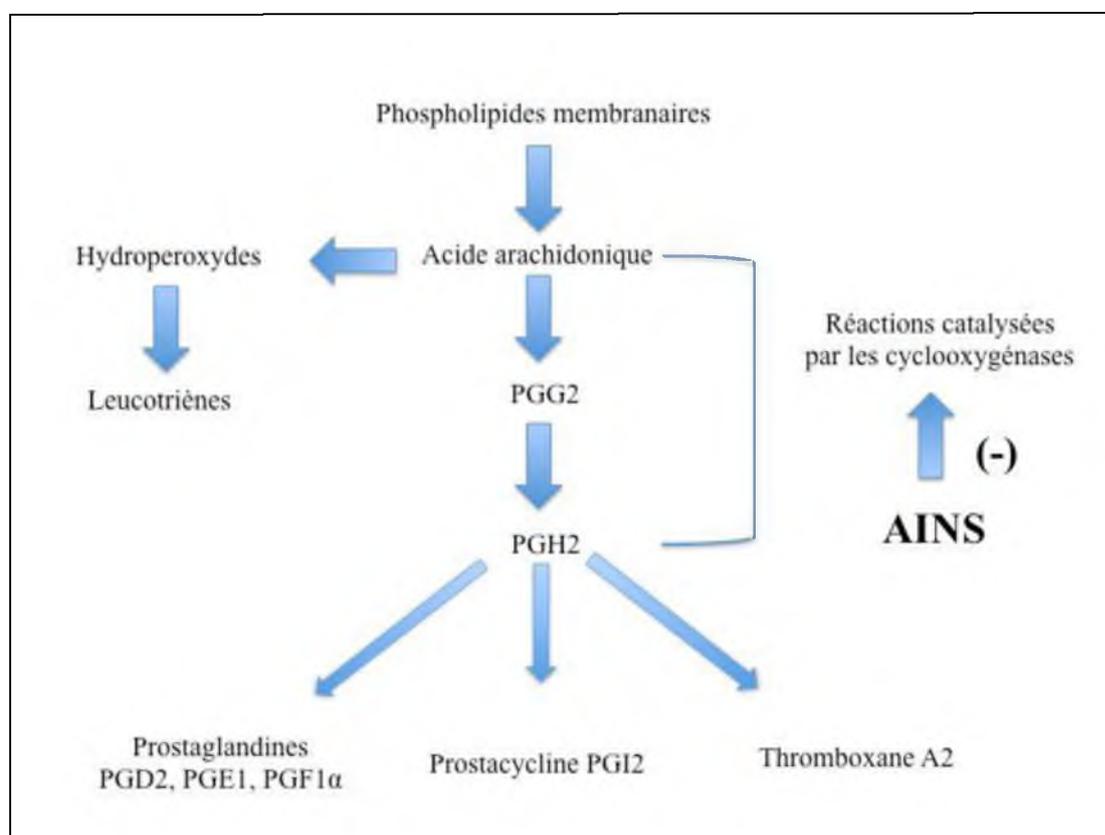


Figure 12: mécanisme d'action des AINS (105).

III.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens:

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon

un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse (105).

Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes (Figure 12).

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (107).

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires (figure13). Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire (108).

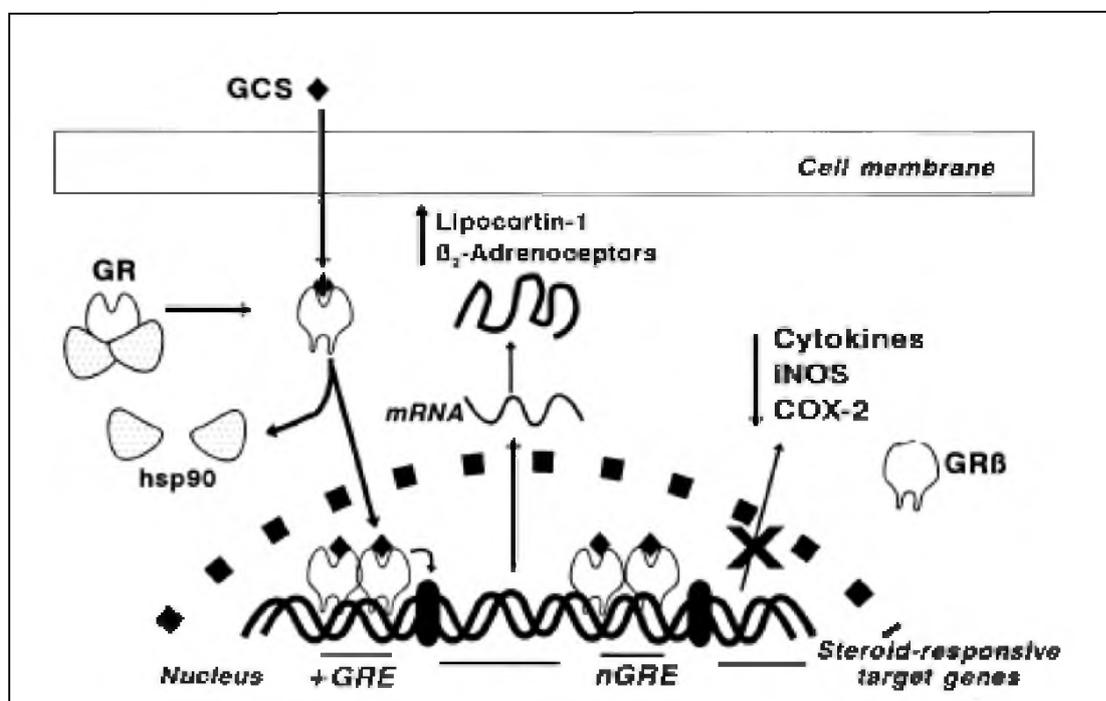


Figure 13: Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (107).

II.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale:

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (107). Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le tableau 4.

Tableau 4: Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires (107).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Oedemes, douleurs rhumatismales
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Feuilles, Racines	Ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R.</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Nerium oleander L.</i>	Apocynaceae	Fleurs	Laurier rose	Douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pédaliacées	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, nevralgie, maux de tête, fièvre
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	Ericaceae	Feuilles	Rhododendron pontique	Oedèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglans regia L.</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma, Malaria
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	Graines	Onagre bisannuelle	Douleurs rhumatismales,

Chapitre IV: La plante médicinale *Anethum. G*:

IV.1.Définition:

L'aneth est une plante de la famille des Apiacées (ou Umbellifères).

Nom scientifique : *Anethum graveolens* L., famille des Apiacées (ombellifères), genre *Anethum*.

Synonymes : *Anethum sowa* Roxburgh, *Ferula marathrophylla* W. G. Walpers, *Peucedanum anethum* Baillon, *Peucedanum graveolens* L., *Peucedanum sowa* (Roxburgh) Kurz.

Origine du nom : Aneth vient du latin *anethum*, emprunté au grec *anêthon*, d'origine inconnue, et *graveolens* signifie en latin « d'odeur forte », composé de « *gravis* » (lourd, fort) et « *olens* » (sentant) **(108)**.

Nom commun : aneth, fenouil bâtard, faux anis, fenouil puant Il est cultivé comme plante condimentaire pour ses feuilles et ses graines très aromatiques, et se rapproche du fenouil par son odeur et ses propriétés, d'où ses noms de fenouil bâtard ou faux anis. Le nectar de ses fleurs est très apprécié des abeilles **(108)**.

Plante annuelle de 20-50 cm, glabre, glaucescente, fétide, à racine pivotante **(109)** :

-Tige grêle, striée, creuse

-Feuilles tripennatiséquées, toutes finement divisées en lanières filiformes, les supérieures

Sessiles sur une gaine plus courte que le limbe

- fleurs jaunes, en ombelles à 15-30 rayons inégaux

- Involucre et involucre nuls

- Calice à limbe nul

- Pétales entiers, suborbiculaires-tronqués, à pointe courbée en dedans

- Fruit ovale-elliptique, comprimé par le dos, entouré d'un large rebord plan

-Méricarpes à 5 côtes, les trois dorsales saillantes, filiformes, carénées, les deux marginales

dilatées en aile aplanie

-Graine à face commissurale plane.

IV.2. Répartition géographique:

Cosmopolite, spontanée et cultivée, originaire de la région méditerranéenne, cette annuelle à l'arome délicieux atteint 1m de hauteur, avec des feuilles divisées en filaments fragiles. Elle expose en été des fleurs jaune vif, suivies de graines très concentrées. Feuilles et graines sont aromatiques, les graines étant depuis toujours utilisées pour faciliter la digestion (110).

IV.3. Description de la plante:

Plante herbacée, à tige dressée, pouvant atteindre 1,7 m de haut. Feuilles oblongues à ovées, tripennées de 20-40 sur 10-20 cm, les derniers segments sont filiformes. Ombelles de 15 cm de diamètre, nombreuses fleurs, pétales jaunes. Fruit ovoïde-elliptique de 4 mm sur 2 mm. Cette espèce est fréquemment confondue avec *Foeniculum vulgare*, laquelle a une gousse pétiolaire plus large et toutes les côtes de fruit égal (111).

IV.4. La classification phylogénétique: (112)

Est une méthode où seuls les caractères empiriquement observables et propres au rang d'espèce doivent être retenus, car étant les seuls témoins de l'héritage ancestral de chaque espèce.

Règne : *Plantae*

Clade : *Angiospermes*

Clade : *Dicotylédones vraies*

Clade : *Astéridées*

Clade : *Campanulidées*

Ordre : *Apiales*

Famille : *Apiaceae*

Espèce : *Anethum graveolens*



A. LA FLEUR (113)



B. LA PARIE AERIENNE(113)



C. CAITULE (113)



D. LA FEUILLE (113)

Figure14 : Aspect morphologique de la plante *Anethum.G* (113)

D.5.Principaux constituants:(114)

- ✓ Des tanins.
- ✓ Des mucilages.
- ✓ Des matières résineuses.
- ✓ Une huile essentielle.
- ✓ Des flavonoïdes.

IV.6.Propriétés/indications:

Propriétés médicinales de l'aneth :

➤ **Utilisation interne :**

Traitement des troubles digestifs, comme les flatulences, les coliques ou les nausées et les vomissements. (114)

➤ **Utilisation externe :**

Cosmétique : l'aneth entre parfois dans la composition de certains produits de beauté. (114)

Indications thérapeutique usuelles :

L'aneth permet de lutter contre divers troubles digestifs, essentiellement les flatulences. (114)

Autre indications thérapeutiques démontrées :

L'huile essentielle d'aneth a la propriété de soulager les personnes souffrant de coliques et de spasmes intestinaux. L'aneth est aussi souvent associé à d'autres plantes pour traiter les états grippaux, les rhumes ou la toux. Croquer quelques graines d'aneth après les repas permet d'atténuer la mauvaise haleine (114).

IV.7. Formes d'utilisation et dosage:

L'huile essentielle doit être administrée à des doses minimales et est déconseillée chez les femmes enceintes ou qui allaitent. Elle n'est délivrée que sur prescription médicale (115).

IV.8. Utilisation en médecine traditionnelle:

Ses propriétés sont stomachique, digestive, apéritive, antispasmodique, diurétique, anti-inflammatoire, galactagogue (lactation), calmante et préparant au sommeil.

-Utilisé en infusion, l'aneth constitue un excellent stimulant du système digestif.

-Ses graines, en infusion, permettent d'arrêter le hoquet, mal de tête, toux des enfants.

Autres indications : dyspepsie, vomissements d'origine nerveuse, flatulences, insuffisance hépatobiliaire aide la lactation, gaz intestinaux, spasmes, crampes et en tant qu'antiseptique intestinal (116).

Dans l'histoire, il fut aussi utilisé pour l'épilepsie, et pour favoriser le lait des nourrices, pour calmer les convives ayant trop bu dans les banquets, pour ses vertus aphrodisiaques et contre les mauvais sorts, pour favoriser les capacités du cerveau (XVII^e siècle), pour maintenir la chaleur et l'énergie du corps et apporter une intense vitalité et aussi pour dynamiser le pouvoir d'attraction sur le sexe opposé (XVII^e siècle) (116).

Chapitre V: la cardiotoxicité par le doxorubicine:

V.1.Introduction:

Les topoisomirase I et II (top I et II) sont des enzymes essentielles au maintien de topologie du génome humain et sont donc des cibles potentielles pour bloquer la synthèse de cellules cancéreuses. Ces enzymes qui sont surexprimées dans les cellules cancéreuses sont la cible de molécules déjà utilisées en chimiothérapie anticancéreuse (117).

V.2.Généralité sur le doxorubicine:

Le doxorubicine est un médicament anticancéreux de la famille des anthracyclines. Produite tout naturellement par des actinobactéries de genre Streptomyces, elle a été isolée pour la première fois en 1960 et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 (117,118). Depuis, c'est le meilleur antinéoplasique connu et le plus utilisé, entre autres dans le traitement de cancers tels que les leucémies et les tumeurs solides (119). Son administration se fait par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée (117). Les demi-vies de le doxorubicine sont: de 8 à 25 minutes, de 1h30 à 10h et de 24h à 48h. La présence de la deuxième phase de demi-vie serait due au métabolisme du médicament au niveau du foie, en doxorubicinol, et la troisième phase serait attribuable au relâchement du médicament des sites de liaison dans les tissus (119). Le doxorubicine ainsi que ses métabolites seraient excrétés majoritairement par la bile. Cependant, S% serait excrété par les voies urinaires ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine, soit la couleur de ce médicament, quelques jours après le traitement (119).

V.3.Les raisons d'utiliser ce médicament:

Le DOX, employés seuls ou en combinaison avec d'autres médicaments anticancéreux, utilisés pour traiter :

* la leucémie aigue non lymphoblastique (LANL) chez les adultes, comme traitement de première intention (117).

* la leucémie aigue lymphoblastique (LAL) chez les adultes et les enfants, comme traitement de deuxième intention (117).

V.4. Les effets de ce médicament:

Le DOX c'est un médicament anticancéreuse (agent chimio thérapeutique), qui agissent en détruisant les cellules qui se divisent rapidement, par exemple, les cellules cancéreuses. Ce faisant, ils peuvent aussi affecter les cellules saines **(120)**.

Chez les gens atteints de leucémie, la moelle osseuse produit des globules blancs anormaux. Les globules anormaux sont des cellules leucémiques (des cellules cancéreuses) **(118)**.

Le DOX ne doit pas s'administrer par voie intermusculaire, sous-cutanée, orale ni intrathécale **(121)**.

V.5. Principales indications: (122)

Doxorubicine et épirubicine: ses indications sont assez nombreuses :

- Carcinomes du sein: Taux de réponse 40 à 50%.
- Sarcomes des os et des parties molles.
- Maladie de Hodgkin, lymphomes non hodgkiniens.
- Tumeurs solides de l'enfant.
- Cancers du poumon.
- Leucémies aiguës et chroniques.
- Cancers de la vessie;
- Cancer de l'ovaire
- Cancer de l'estomac

V.6. Doxorubicine liposomale pégylée:(CAELYX®): (123)

Dans le doxorubicine liposomale, les molécules sont encapsulées dans un enduit gras connu sous le nom de liposome. Le liposome permet au doxorubicine de traverser la barrière hémato-encéphalique et de rester dans la circulation plus longtemps de sorte qu'une plus grande quantité de chimiothérapie est livrée aux cellules tumorales, avec moins d'effets secondaires sur le tissu sain que le doxorubicine normale. Le doxorubicine liposomale est un liquide rouge léger, donné en intraveineuse pendant 60-90 minutes.

L'encapsulation liposomale de la doxorubicine permet de réduire la libération non spécifique du produit actif dans les tissus normaux et d'abaisser le pic plasmatique du produit libre, pic qui est rendu responsable de la toxicité.

De plus, la présentation liposomale semble apporter une délivrance plus spécifique de la

doxorubicine au niveau des tumeurs. La demi-vie terminale dans la circulation chez l'homme est d'environ 55 heures, soit augmentée de 100 % par rapport à la doxorubicine standard. Les essais de phase I en monothérapie ont montré que la principale toxicité dose-limitante est la survenue d'une toxicité cutané-muqueuse.

V.7.Extravasation:

L'extravasation de la doxorubicine pendant son administration par voie I.V (intraveineuse) peut occasionner une douleur locale, des lésions tissulaires graves (vésication, cellulite grave), voire la nécrose des tissus (124). Si des signes ou des symptômes d'extravasation se manifestent, il faut interrompre immédiatement l'injection ou la perfusion (124).

V.8.Principaux mécanismes d'action de l'anthracyclines:

La compréhension de l'action anticancéreuse des anthracyclines a considérablement progressé avec les développements de la biologie et de la pharmacologie cellulaire. Plusieurs mécanismes sont intriqués (118) :

Le transport nucléaire : l'anthracycline pénètre la cellule par le récepteur pore MDR (multi Drug résistance), puis est transportée au noyau sur un protéasome ; l'intercalation : en s'intercalant dans l'acide désoxyribonucléique (ADN), les anthracyclines inhibent la transcription et donc la synthèse protéique.

Leur structure multi cyclique planaire, nécessaire à cette action, leur permet de s'interposer entre deux paires de bases adjacentes (figure14);inhibition de la topo-isomérase II : la formation de complexes entre anthracycline-ADN-topo-isomérase II empêche l'enzyme de réassembler les brins d'ADN dissociés ; l radicaux libres : la production de radicaux libres après fixation sur l'ADN entraîne de nouvelles lésions, de l'ADN, localement, mais aussi à distance (membranes, mitochondries);l'apoptose : l'action proapoptotique des anthracyclines est en partie initiée par les radicaux libres, qui activent la protéine p53 et sa fixation sur l'ADN. La p53 y active la transcription du gène Bax (médiateur proapoptotique), inhibe celle du gène Bcl-XL (médiateur antiapoptotique).

Bax induit la libération du cytochrome c par la mitochondrie, par ouverture du pore mitochondrial, tandis que Bcl-XL a l'effet inverse.

Cette libération du cytochrome c entraîne la formation de l'apoptosome, complexe effecteur comprenant l'apoptosis activating factor-1 (Apaf-1), le cytochrome c et la pro-caspase-9. La p53 interagit aussi avec la topoisoméraseII, dont elle inhibe la fonction ligase (119).

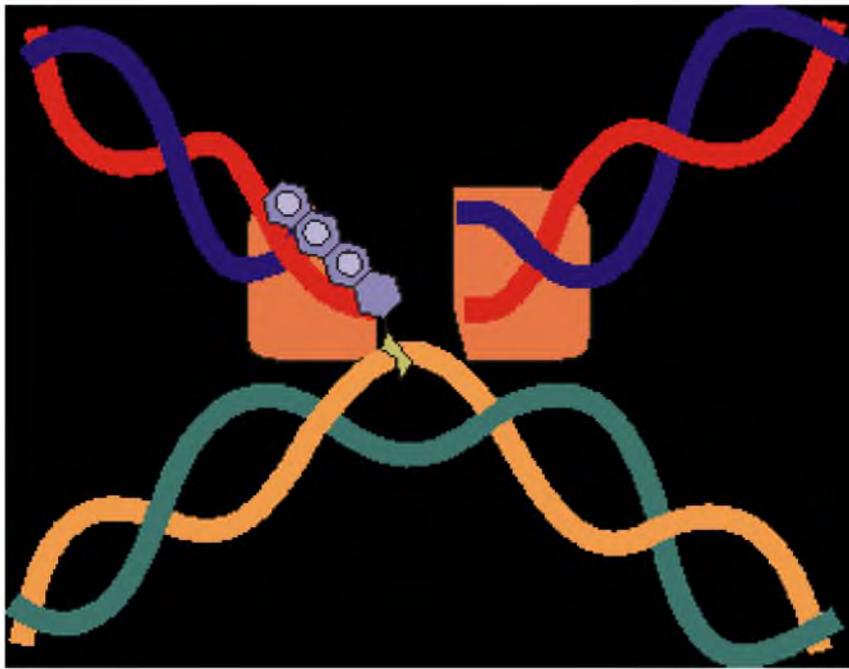
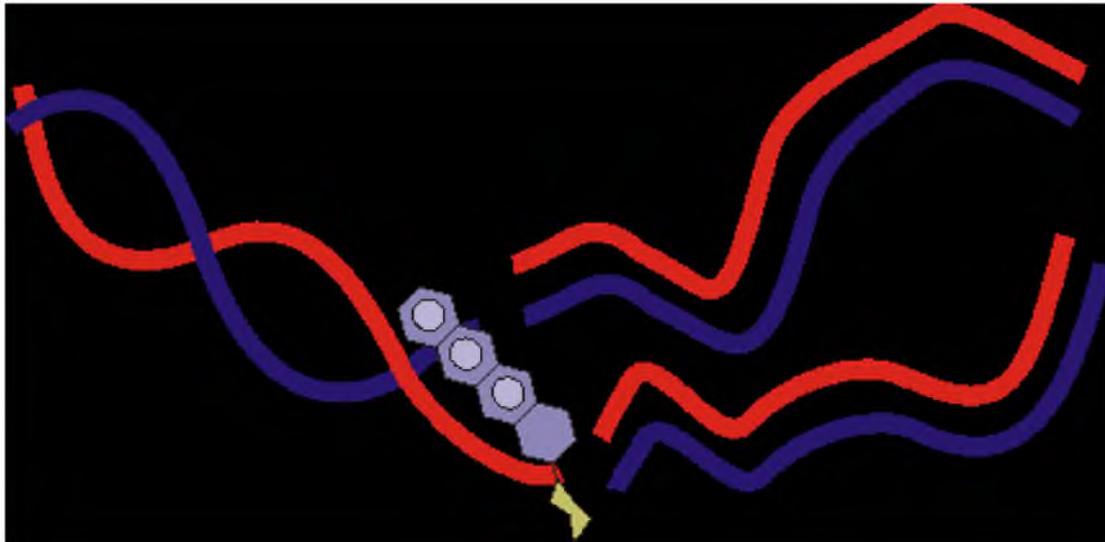


Figure 15: Mécanisme d'action des Anthracyclines: Intercalation dans l'ADN et stabilisation de l'enzyme "Topoisome II".

-Transport nucléaire:

L'anthracycline pénètre la cellule par le récepteur-pore MDR (multi Drug résistance), puis est transportée au noyau sur un protéasome (125).

-Intercalation:

En s'intercalant dans ADN, les anthracyclines inhibent la transcription et donc la synthèse protéique. Leur structure multi cyclique planaire, nécessaire à cette action, leur permet de s'interposer entre deux paires de bases adjacentes (125).

-Inhibition de la topo-isomérase II:

La formation de complexes entre anthracycline-ADN-topo isomérase II empêche l'enzyme de réassembler les brins d'ADN dissociés (125).

-Les radicaux libres:

La production de radicaux libres après fixation sur l'ADN entraîne de nouvelles lésions, de l'ADN, localement, mais aussi à distance (membranes, mitochondries) (125).

-Appotose:

L'action proapoptotique des anthracyclines est en partie initiée par les radicaux libres, qui activent la protéine p53 et sa fixation sur l'ADN, la p53 y active la transcription de gène Bax (médiateur pro apoptotique), inhibe celle de gène Bcl-XL (médiateur anti apoptotique) (125).

Bax induit la libération du cytochrome C par la mitochondrie, par ouverture du pore mitochondrial, tandis que Bcl-XL a l'effet inverse (125)

Cette libération du cytochrome C entraîne la formation de l'apoptosome, complexe effecteur comprenant l'apoptosis activating factor-1 (Alfa-1), le cytochrome C et la pro-caspase-9 (125).

La p53 interagit aussi avec la topo-isomérase II, dentelle inhibe la fonction ligase (125).

V.9.Toxicité cardiaque des anthracyclines:doxorubicine:

V.9.1.Physiopathologie:

***Toxicité aiguë et troubles du rythme:**

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'apparition de troubles du rythme lors des traitements par les anthracyclines :

-La toxicité directe de l'anthracycline ou de ses métabolites sur le myocarde (126).

-La libération de catécholamines et d'histamine induite par l'anthracycline **(126)**.

-La perturbation de la circulation transmembranaire du potassium, du calcium et du sodium **(126)**.

Les modifications de l'auscultation cardiaque parfois observées lors de la perfusion d'anthracyclines sont secondaires à la stimulation de la sécrétion de noradrénaline ainsi qu'à l'augmentation des résistances périphériques et de la tachycardie induite par l'histamine **(127)**.

***Toxicité retardée:**

La pathogénie de la toxicité cardiaque chronique des anthracyclines n'est pas clairement définie et est probablement multifactorielle, les principaux mécanismes retrouvés sont représentés par:

-Production de radicaux libres: Le métabolisme de la doxorubicine entraîne l'apparition de radicaux libres, principalement l'anion super oxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^- **(128)**.

Ces molécules chargées négativement sont très instables et responsables de l'oxydation des lipides polyinsaturés, avec désorganisation membranaire et dysfonctionnement de la respiration mitochondriale **(129)**. Les cellules myocardiques sont particulièrement sensibles aux radicaux libres car elles sont pauvres en agents antioxydants comme la catalase et la super oxyde dismutase **(130)**.

· Perturbation de l'homéostasie calcique : Les anthracyclines sont aussi responsables d'un largage intracellulaire de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique **(131)**. Cette augmentation de la concentration de Ca^{2+} intra cytoplasmique permet l'activation d'enzymes lytiques protéases et lipases calcium dépendantes **(132)**.

· Modulation de l'expression de certains gènes: Il est aussi constaté une inhibition par les anthracyclines de l'expression des gènes actine, troponine et myosine codant des protéines qui participent à la contraction du myocarde **(133)**.

· D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la cardiotoxicité des anthracyclines et s'ajoutent probablement aux précédents, avec notamment rupture de l'homéostasie du fer cardiaque **(130)**, inhibition de la topoisoméraseII **(130)**, largage de cytokines cardiotoxiques tels le TNF (tumor necrosis factor) ou l'interleukine 2 **(130)**, dysfonctionnement des neurones adrénergiques **(132)**.

V.9.2.Aspects biochimiques de la carditoxicité des anthracyclines:

La meilleure connaissance des mécanismes d'action cellulaire des anthracyclines a permis de démontrer que l'activité anti tumorale et la cardiotoxicité correspondaient en fait à

des cibles intracellulaires différentes (figure 15) (133).

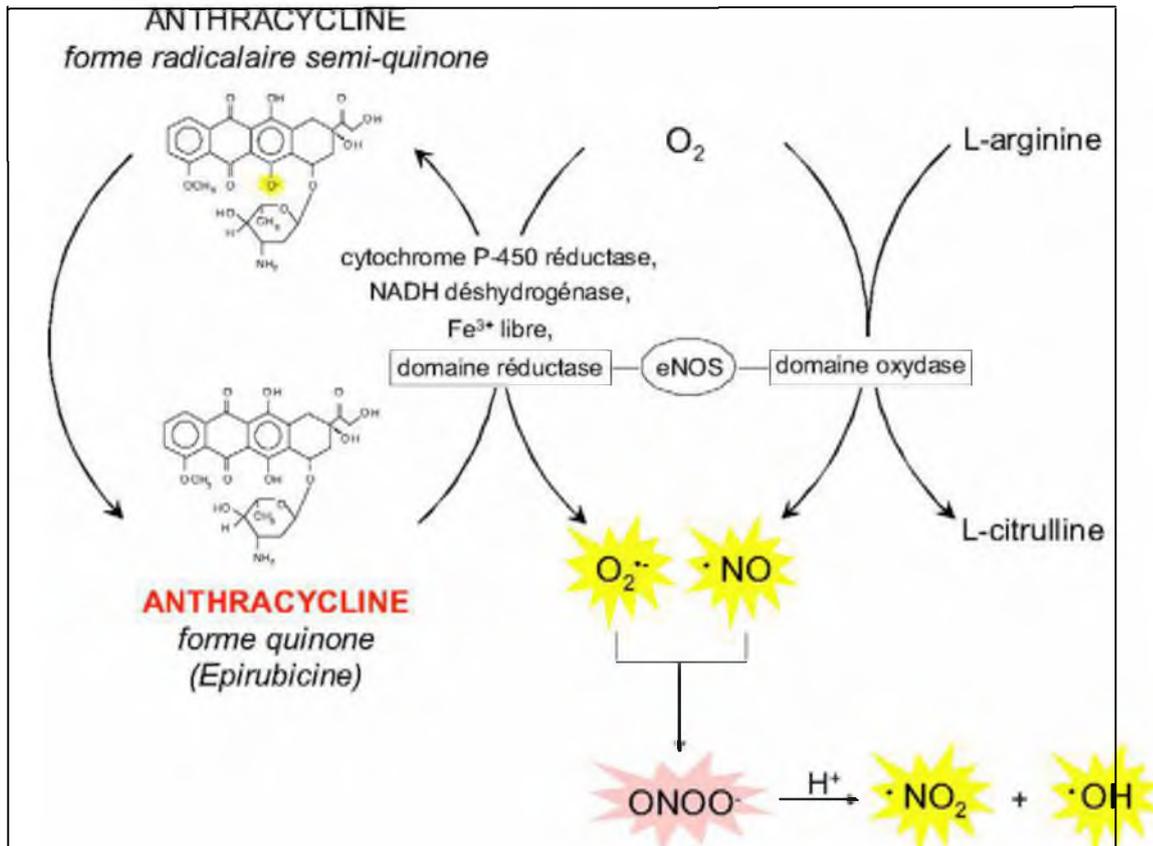


Figure 16: Production de radicaux super-oxydes par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines et formation de peroxy-nitries, issus de la production concomitante d'O₂ et de monoxyde d'azote (NO) par les anthracyclines (133).

Le mécanisme principal de cytotoxicité des anthracyclines envers les cellules tumorales est lié à l'intercalation du médicament au niveau de l'ADN, et à l'inhibition de l'enzyme nucléaire, le topo isomérase II. Or, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules cardiaques. Ce constat, ainsi que l'importance de la cardiotoxicité ainsi engendrée, ont conduit à la recherche d'autres mécanismes susceptibles de se rendre compte de la toxicité cardiaque des anthracyclines. Plusieurs hypothèses sont alors avancées (133).

V.9.2.1. Hypothèse radicalaire:

L'hypothèse du développement d'un stress oxydatif induit par un traitement aux anthracyclines a été largement documentée. L'augmentation de la production de radicaux libres associée à une diminution des systèmes de défenses anti oxydantes serait, en partie, à l'origine des atteintes irréversibles observées au niveau des cardiomyocytes (133).

a. Formations d'espèces activées de l'oxygène lors du métabolisme de DOX:

la DOX se capable d'induire une production accrue de radicaux libres oxygénés, du fait de leur structure de type quinone, pouvant subir une réduction, catalysée par les flavines réductases, pour aboutir à la formation d'un dérivé semi-quinone radicalaire **(134)**. Ce dérivé peut lui-même subir une réduction en hydroquinone, ou retourner à la forme quinone en cédant son électron célibataire à l'oxygène moléculaire, produisant ainsi des radicaux superoxydes (O_2^-) **(135)**.

Une deuxième voie de génération de radicaux libres par les anthracyclines fait intervenir la formation d'un complexe organométallique entre les anthracyclines et le fer. Au sein de la cellule, l'ion ferrique Fe^{3+} libre, libéré de ses sites de stockage, transferrine et ferritine par l'attaque des anthracyclines, se lie à trois molécules d'anthracyclines pour former un complexe très stable : Fe^3 (anthracycline)³. Ce complexe peut subir un cycle interne d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe radicalaire Fe^{2+} (anthracycline)³. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation de radicaux O_2 . En l'absence de métaux de transition libres (fer, cuivre), les radicaux O_2^- ne sont pas très toxiques pour les structures environnantes, car ils sont normalement transformés en peroxyde d'hydrogène par le super oxyde dismutase (SOD). L' H_2O_2 peut ensuite être décomposé en eau et oxygène moléculaire grâce à l'action des catalases et des glutathions peroxydases (GSHPX) **(136)**. Toutefois, les catalases ne sont pas toujours efficaces, et le cœur est un des organes qui en est le moins pourvu. En outre, certains travaux ont montré, dans les cœurs de rats, que les anthracyclines étaient capables d'induire une déplétion en enzymes anti oxydantes, notamment en SOD et en GSH-PX. Il en résulte une accumulation de radicaux O_2^- et de H_2O_2 , à l'origine d'une production accrue de radicaux hydroxyles (OH) par la voie de Fenton, d'autant que le complexe Fe^3 -(anthracycline)³ se comporte comme un puissant catalyseur de la réaction. Cela explique que le tissu cardiaque, dont les défenses anti oxydantes sont amoindries par la présence de l'anthracycline, soit particulièrement sensible au stress oxydatif engendré par cette dernière.

aa. Formations d'espèces activées de l'azote par interactions entre les espèces radicalaires:

Du fait du contexte inflammatoire induit par les anthracyclines, une grande quantité de monoxyde d'azote (NO) est produite à partir de la L-arginine grâce à l'activation de la forme

inductible des NO synthases présente au niveau des macrophages et des cellules vasculaires. Il a été démontré que la production concomitante de grandes quantités d'O₂⁻ et de NO pouvait induire la formation de peroxynitrite (ONOO⁻), qui pouvait lui-même générer le radical OH indépendamment de la mise en jeu des processus faisant intervenir le fer. Très récemment, le rôle de la dérégulation du NO, média par les anthracyclines, a été décrit ainsi que différentes perspectives de manipulation pharmacologique du métabolisme du NO, afin de développer une nouvelle approche dans la prévention de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines (137).

aaa.Aspects toxiques cellulaires de la production d'espèces oxydantes par les anthracyclines:(138)

La production de radicaux libres par les anthracyclines, au sein des cellules myocardiques, entraîne une peroxydation lipidique responsable de l'altération des fonctions membranaires. L'homéostasie calcique est alors perturbée. Il s'ensuit une diminution de la contractilité myocardique, ainsi qu'un défaut de relaxation par « excès » du calcium disponible au niveau des myofibrilles. De plus, le stress oxydatif associé au traitement par les anthracyclines peut induire directement des lésions mitochondriales ayant pour conséquence une altération des processus de transferts membranaires et une évolution de la cellule vers l'apoptose. La formation d'ONOO⁻, au sein des cardiomyocytes, pourrait également jouer un rôle très important dans la cardiotoxicité induite par les anthracyclines, du fait du spectre de ses actions toxiques.

V.9.2.2.Hypothèse des métabolites toxiques issus des métabolismes des anthracyclines: (138)

La cardiotoxicité des anthracyclines pourrait aussi être liée à la formation de métabolites toxiques directement issus du métabolisme de ces substances. Par exemple, l'épirubicinol, métabolite de l'épirubicine, formé dans le cytosol par des enzymes NADPH-dépendantes serait moins actif sur le plan tumoral mais plus toxique sur le cœur que son précurseur, l'épirubicine. Ce métabolite est capable d'inhiber certaines ATPases Ca²⁺ dépendantes du réticulum sarcoplasmique. Ces métabolites, une fois formés dans les cellules, pourraient par leurs actions propres membranaires altérer les mouvements ioniques, en particulier les transferts calciques. La cardiotoxicité serait alors liée à des spécificités cellulaires en relation avec le degré de métabolisme de l'anthracycline. Compte des mécanismes impliqués dans le développement de l'insuffisance (138).

V.9.2.3.Hypothèse liée au niveau de l'apoptose cellulaires induites par le DOX: (154)

Parmi les nombreuses hypothèses qui ont été évoquées pour rendre cardiaque, quel le que soit son origine physiopathologique, le degré de mort cellulaire par apoptose occupe une place de choix. Même si l'apoptose affecte moins de 1 % des myocytes cardiaques, dix semaines après la dernière injection de substances anti tumorales, de nombreuses études in vitro et in vivo ont montré que la DOX pouvait conduire à une perte de cellules cardiaques par apoptose.

V.9.3.Aspects histologiques: (138)

L'administration d'anthracyclines entraîne des lésions des myocytes et du tissu interstitiel cardiaque.

Dès les premières heures qui suivent l'injection de doxorubicine chez l'animal apparaissent des modifications du réticulum sarcoplasmique (RS) et des mitochondries myocytaires. Ces lésions s'aggravent ensuite, aboutissant en 3 à 5 jours à une raréfaction des citernes terminales du RS, parfois à sa disparition complète avec aspect de vacuoles, et à un œdème mitochondrial, suivis de lésions des myofibrilles, désorganisées puis détruites. Les mêmes lésions sont observées à doses thérapeutiques (30-60 mg/m²) chez l'homme, minimales après une injection unique (biopsie myocardique), « caricaturales » après administration prolongée ayant atteint des doses cumulatives élevées. Les mitochondries sont alors surchargées en dépôts calciques.

Des modifications du tissu interstitiel sont moins souvent associées. Les myocytes normaux sont enserrés dans un réseau de faisceaux de fibres collagènes réalisant un véritable filet périmyocytaire, renforcé longitudinalement par endroits en trousseaux fibreux denses. Des ponts Collagènes relient les myocytes voisins entre eux aux capillaires et au réseau collagène, empêchant le glissement cellulaire lors de la contraction cardiaque. L'évaluation histologique de la toxicité des anthracyclines a été rendue possible grâce au développement des techniques de biopsie endomyocardique.

L'examen anatomopathologique des fragments de cœur de patients décédés d'une cardiomyopathie dilatée liée aux anthracyclines montre un épaississement endocardique et une fibrose interstitielle (140). Les myocytes apparaissent petits, réfractés avec un cytoplasme présentant une accumulation lipidique, des lysosomes nombreux, une perte myofibrillaire et une vacuolisation par distension du réticulum sarcoplasmique, puis un

CHAPITRE V: LA CARDIOTOXICITÉ PAR LE DOXORUBICINE

œdème mitochondrial et une dégénérescence nucléaire surviennent, conduisant à la mort cellulaire. Ces lésions pourraient être évolutives même après l'arrêt de la chimiothérapie avec hypertrophie compensatrice des myocytes intacts et fibrose cicatricielle.

En fonction du nombre de cellules atteintes et de la sévérité des altérations, une classification a été établie, indiquant trois stades de gravité en fonction des lésions histologiques constatées (Tableau 5). Le stade I correspond aux modifications histologiques quasi-constantes chez tout sujet traité par une anthracycline au-delà d'une DCT de 250 mg/m². Le stade II est le score moyen des malades ayant reçu une DCT de 500 mg/m², et correspond à un niveau d'alerte nécessitant une vigilance supplémentaire. Le stade III représente un niveau de toxicité cardiaque certaine, incompatible avec la poursuite du traitement (141). Il existe une relation linéaire entre le score biopsique et la DCT d'anthracyclines.

Tableau 5: Classification du score biopsique de gravité en fonction des lésions histologiques observées par BEM (142).

Score biopsique de gravité	Modification histologique
Grade 0	Aucune modification visible, BEM normale
Grade I	Anomalies précoces portant sur moins de 5 % des cellules de l'échantillon
Grade II A	Anomalies définitives portant sur 5 à 15 % des cellules
II	Anomalies portant sur 16 à 25 % des cellules
II B	Anomalies portant sur 26 à 35 % des cellules
Grade III	Lésions cellulaires diffuses portant sur plus de 35 % des cellules incluses avec altérations sévères : perte totale des myofibrilles, des organites intracellulaires, dégénérescence nucléaire et mitochondriale

V.9.4.Facteurs de risques:

Il est difficile de prévoir quelles sont les patients les plus à risque de cardiotoxicité après un traitement par anthracycline. Il existe très peu de données prospectives dans la littérature, la plupart des recommandations reposent sur des études rétrospectives. Certains facteurs de risque prédisposent à l'apparition d'une toxicité cardiovasculaire lors de l'administration des anthracyclines. Les facteurs propres au traitement sont la dose cumulée des anthracyclines, la durée de perfusion, le rythme d'administration, l'utilisation antérieure ou concomitante de plusieurs agents pouvant entraîner une toxicité cardiaque. Les facteurs propres au patient sont les antécédents d'irradiation médiastinale, les facteurs de risque cardiovasculaires classiques (sexe masculin, âge élevé, hypertension artérielle, diabète, dyslipidémies, tabagisme, surpoids, antécédents personnels et familiaux vasculaires), l'existence d'une cardiopathie ou d'une pathologie pulmonaire sous-jacente entraînant une altération de la fonction respiratoire, les troubles biologiques pouvant favoriser la survenue de troubles cardiaques : l'anémie, l'hypokaliémie, l'hypomagnésémie, une dysthyroïdie. Les facteurs propres à la tumeur sont l'existence d'un envahissement cardiaque par la tumeur ou leur contiguïté et le retentissement de la tumeur sur la fonction respiratoire. Une équipe danoise a identifié un ensemble de facteurs de risque de développer une cardiotoxicité liée aux anthracyclines dans le traitement du cancer du sein, dans une étude rétrospective apparue dans le Journal de l'institut nationale américaine du cancer (JNCI) **(143)**.

Ils ont suivi 1.097 patientes consécutives traitées pour un cancer du sein dans un seul hôpital près de la capitale danoise entre 1983 et 2003.

Ils ont trouvé que l'âge, une prédisposition aux maladies cardiaques (Diabète ; ménopause; HTA; Cardiopathie sous-jacente; Obésité...), une irradiation thoracique préalable et une hormonothérapie antérieure sont des facteurs associés au risque de développer une maladie cardiaque après un traitement par l'épirubicine. Ainsi, l'hormonothérapie augmentait de 87,3% le risque et pour toute augmentation de 100 mg/m² de la dose cumulée d'anthracyclines, le risque de cardiotoxicité augmentait de 40% **(143)**.

V.9.5.Aspect cliniques:

La cardiotoxicité induite par les anthracyclines peut revêtir plusieurs aspects cliniques, bien différents dans leurs manifestations et leurs conséquences. En fonction de leur délai d'apparition par rapport à l'introduction de l'anthracycline, quatre formes cliniques de cardiotoxicité ont été décrites **(144)**.

V.9.6.Prévention:

La prévention de la toxicité cardiaque des anthracyclines a beaucoup progressé au cours des dernières années, qui ont été marquées par l'établissement de protocoles de surveillance thérapeutique mieux formalisés et le recours plus large aux thérapeutiques associées, telles que le dexrazoxane (145).

***Utilisation d'agent protecteur de la toxicité cardiaque:**

-Ex: Chélateur de fer:

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, le fer, complexé avec les anthracyclines, joue un rôle important dans la formation de radicaux libres O_2^- et OH impliqués dans le mécanisme de la cardiotoxicité des anthracyclines (146).

Ainsi, l'utilisation de molécules telles que le dexrazoxane (Cardioxane®) capables de chélater le fer intracellulaire libre, de diminuer la formation du complexe Fe^{3+} - (anthracycline)³ et par conséquent de réduire la production de radicaux libres, apparaît comme une voie prometteuse pour limiter la cardiotoxicité des anthracyclines (146).

Récemment, la Co-administration d'anthracycline et de carvedilol, bêtabloquant utilisé en clinique dans le traitement de l'IC a conduit à des résultats très intéressants dans la protection de la cardiotoxicité mitochondriale induite par les anthracyclines. Chez le rat. Cet effet protecteur serait lié à son activité antioxydante et attribué à sa capacité de chélater le fer libre (147).

- Antioxydants.
- Accélérateurs de la dégradation des peroxy-nitrites.
- Agents découplant de la NO synthase (NOS).
- Vecteurs antioxydants mitochondriaux.

V.9.7.Surveillance de la fonction cardiaque:

La prévention de la cardiotoxicité repose, avant tout initiation d'un traitement à base d'anthracycline, sur l'évaluation de la fonction cardiaque, comprenant la réalisation d'un examen clinique soigneux, d'un ECG et d'une mesure de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG). La mesure de la FEVG, par exploration fonctionnelle non invasive, échocardiographie et/ou angiographie isotopique, est essentielle pour poser le diagnostic d'insuffisance cardiaque (148). Les critères habituellement retenus d'arrêt de l'anthracycline

CHAPITRE V: LA CARDIOTOXICITÉ PAR LE DOXORUBICINE

sont une FEVG inférieure à 50 %, et/ou une diminution de 20 % ou plus de la valeur mesurée avant la mise en route du traitement. La fonction cardiaque du patient doit ensuite être surveillée pendant toute la durée du traitement, généralement avant chaque nouveau cycle, afin de réduire le risque d'atteinte cardiaque grave **(122)**.

I. Matériel :

I.1. Matériel biologique (Echantillonnage) :

I.1.1. Matériel végétal : « *Anethum graveolens* »

L'*Anethum graveolens* est récolté durant l'été, que ce soit en Europe, en Asie ou en Afrique du Nord. La récolte a été réalisée à la fin du mois d'avril. La partie aérienne (les grains d'*Anethum graveolens*) est la partie nécessaire de la récolte, la plante sèche a été pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

Le médicament anticancéreux : le doxorubicine

Le médicament anticancéreux que nous avons utilisé pour provoquer le stress oxydant et la cardiotoxicité, y associée, chez les rats est le doxorubicine 15mg/kg ; nous a été fourni gracieusement par le service de cancérologie de Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC).

I.1.2. Réactifs chimiques et instrumentations :

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits:

Acide sulfurique (H_2SO_4), acide chlorhydrique (HCl), acide acétique, NaOH, NH_4OH , KI , I_2 , NaCl, $AlCl_3$; acide galique; rétiné quercétine, méthanol, eau distillée, coton.

1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), diclofénac sodique, H_2O_2 , BSA (bovine sérum albumin), Gumme, Arabique, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_3$, TCA, TBA, Vit C, KCl.

Les appareils utilisés:

Spectrophotomètre UV-Visible double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV « 264/3645 nm » (VILBERCOURMAT), Bain Marie (MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOGEX), vortex (VELP), Balance (OHAUS), PH mètre, micro pipette.

I.2. Matériel animal :

I.2.1. Etude expérimentale :

Les 20 rats utilisés dans cette expérimentation sont des rats femelles adultes de souche wister albinos, pesant entre 150 et 200g (au début de l'expérimentation). Issus par élevage au niveau de l'animalerie de l'université des frères Mentouri de Constantine, les rats sont logés

dans des 4 cages métalliques on chaque cage regroupe 5 rats. Ils ont libres accès à l'eau et la nourriture. Les rats sont maintenus à une température ambiante 30C° et photopériode de 8h à 16h. Ils ont été traités conformément au principe énonces dans la manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation

II. Méthodes :

II.1. Préparation des extraits végétaux :

II.1.1. Préparation d'extrait méthanolique :

La partie aérienne grains de *Anethium.G*, ont été nettoyées et séchées à température ambiante, ensuite broyées à l'aide d'un broyeur manuel, pour l'extraction en utilisant de méthanol et eau distillé. Suivant cette méthode 500g de la poudre de la plante dans une lampe avec 100ml de méthanol, met sur un agitateur pendant 24h, puis filtrés à l'aide de papiers filtre 3 fois successif ensuite on les mettre dans l'étuve jusqu'à obtenir d'extrait métanolique sec.

II.1.2. Préparation de l'extrait aqueux :

La partie aérienne grains de *Anethium.G*, ont été nettoyées et séchées à température ambiante, ensuite broyées à l'aide d'un broyeur manuel, pour l'extraction en utilisant le méthanol et l'eau distillé. Suivant cette méthode 40g de la poudre de la plante dans un bécher avec 60 ml d'eau distillé met sur un agitateur pendant 24h, puis filtrés à l'aide de papiers filtre 3 fois successif ensuite on les mettre dans l'étuve jusqu'à obtenir de extrait aqueux sec.

II.2. Screening phytochimique de l'extrait végétale :

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait de la plante ; méthanolique est aqueux
EMAG: extrait méthanolique de l'Anethum graveolens.

EAAG: extrait aqueux de l'Anethum graveolens.

II.2.1. Mise en évidence des tanins :

2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2%. un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité (laisse reposer quelques minutes).

II.2.2. Mise en évidence des saponosides :

- **Test 1** : 5ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10ml d' H_2O pendant 2min. la formation d'une mousse persistante après 15min confirme la présence des saponosides.
- **Test 2** : 5ml de l'extrait ont mélangés avec 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. une couleur rouge-marron de la couche d'interface indique la présence des tris terpènes hétérosidiques.

II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes :

5ml d'extrait sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence de flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune.

II.2.4. Mise en évidence des composés réducteurs :

Ce test est basé sur la réaction de Keller-kiliani. A 1ml de l'extrait ajouter 5ml d'aide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 . la présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert(acide sulfurique).

Parmi les composés réducteurs on note les coumarines ,placer 1g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai, couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette la fluorescence des taches confirme la présence des coumarines .

II.2.5. Mise en évidence des alcaloïdes :

Ce test fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. A l'extrait sec, ajouter 5ml d' HCl au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Wagner (2g de KI et ,1.27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels.

III. Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes d'extrait aqueux, 1ml de l'extrait a été ajouté à 1ml de la solution d' AlCl_3 (2%, dans le méthanol), après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. la concentration des flavonoïdes dans le extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage $y=ax+b$ établie avec la quercitrine à différentes concentrations (0-0.40 $\mu\text{g/ml}$, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que l'extrait servira à la quantification des flavonoïdes. la teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercitrine par grammes du poids d'extrait (mg EQ/gE).

IV. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux d'extrait De la plante .été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifié par oraham (1992).

Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe^{2+}) ; ces derniers réagissent avec le chlorure de fer (FeCl_3) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de l'extrait a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0.016 M) puis 1 ml du FeCl_3 (0.02 M dans le HCl 0.1N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gamme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 19) (0-200 $\mu\text{g/ml}$) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / g E).

V. Activité Anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire in vitro d'extrait méthanolique d'*Anethum.G* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste a préparé quatre solution.

La solution d'essai (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA) 5 % et 0,05 ml d'extrait aqueux et méthanolique avec une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$.

La solution control test (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé. La solution contrôle produit (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extrait aqueux avec une concentration de 250 µg/ml.

La solution standard test (0,5 ml) compose de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 250 µg/ml.

Tous les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N), les échantillons ont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline (Ph=6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV –visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - [(OD \text{ of test solution} - OD \text{ of control} / OD \text{ of test control}] \times 100.$$

OD: la densité optique.

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparé avec le diclofenac sodium (250ug/ml).

VI. Peroxydation des lipides :

-Test 1 : Inhibition de la peroxydation des lipides a été déterminé par dosage de l'acide thiobarbiturique-substances réactives (TBARS) en utilisant l'homogénat foie des rats comme une source riche en lipide avec quelques modifications. Brièvement, 1,0 ml d'échantillon à différentes concentrations (ont été mélangés avec 1,0 ml d'homogénat de foie; puis 0,2 ml FeSO₄ (9 mmol/L) et de l'eau distillée à 2,5 ml, à plus 0,1 ml de H₂O₂ (60 mmol/L). Ont été ajoutés pour initier la peroxydation lipidique. Et après incubation à 37 ° C pendant 60 min, 1 ml de TCA (20%, p/v) et 1,0 ml d'une solution de TBA (0,7%, p/v) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange résultant a été chauffé à 95 ° C pendant 15 min, puis centrifugé à 5000 tours pendant 10 min. L'absorbance de la surnageant a été mesurée à 532 nm. L'eau distillée a été utilisée comme contrôle. L'effet d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé comme suit **(154):**

$$\text{Inhibition rate \%} = (OD_{\text{control}} - OD_{\text{sampl}} / OD_{\text{control}}) \times 100 \%$$

OD_{control} : est l'absorbance du contrôle (l'eau au lieu de l'échantillon).

OD_{sample} : est l'absorbance de l'échantillon.

-Test 2 : Selon la méthode de (Wong, Hashimoto, et Shibamoto, 1995) avec quelques modifications. Il a également été utilisé pour mesurer la capacité antioxydante potentielle d'extrait A et M d'*A. graveolens*. L'homogénat de jaune d'œuf était utilisé comme source riche en lipide, le jaune d'œuf était composé à une concentration de 10% (p/v) dans un KCl (1,15%, p/v). Cette homogénéisation se fait pendant 30s, suivie par traitement aux ultrasons pendant 5 min. Cinq cents microlitres de 10% (p/v) et 100 µl d'extrait EAAG et EMAG avec déférent [C] solubilisé dans méthanol, on a ajouté dans un tube à essai et constitué à 1 ml avec de l'eau distillée, suivi par l'addition de 1,5 ml d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 1,5 ml de 0,8% (p/v) de 2-thiobabaturic acide (TBA) à 1,1% (p/v) de dodécylsulfate de sodium (SDS). Ce mélange a été agité dans un vortex, et chauffé à 95°C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, 5 ml de butanol a été ajouté à chaque tube, agité et centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. L'absorbance du surnageant Il a été mesurée à 532 nm en utilisant un spectrophotomètre.

VII. Activité anti-oxydante :

VII.1. Piégeage du radical hydroxyle :

La méthode de Piégeage du radical hydroxyle adoptée dans cette étude est celle de **Zhong et al. (2010)** ; avec peu modification. Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 1 ml de (9 mM FeSO₄) et 1 ml de 0.3% H₂O₂, 0.5ml de 9mM acide salicylique acid-ethanol solution, 1 ml de l'extrait à différentes concentrations. Après incubation une 60 min à 37°C la lecture est effectuée à une longueur d'onde de 510 nm. L'effet scavenger du radical hydroxyle est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition OH}^\cdot = (A_{\text{control}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

La concentration inhibitrice d'OH[·] de chaque extrait a été par la suite calculé à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en mg/ml et comparée avec celle d'**acide ascorbique (152)**.

VII.2. DPPH (effet scavenger) :

L'activité anti-radicalaire des différents extraits d'*Anethum graveolens* a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire aujaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine (Cuendet et al ; 1997; Burits and Bucar, 2000). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 5

ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour l'extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par l'extrait d'*A.G* a été calculé comme suit: $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$.

VII.3. Reducing power :

Principe :

Ce test est basé principalement sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur **(153)**.

*Méthode de dosage:

Le pouvoir réducteur a été déterminée selon la méthode de Oyaizu (1986); avec quelques modifications dans une première étape, 2,5 ml d'une solution de phosphate buffer (0,2M- pH= 6,6) et 2,5 ml de 1% de potassium ferricyanide sont ajoutés à 2,5 ml des différentes concentrations des extraits. Après incubation de 20 minutes dans un bain marie à 50C°; on a ajouté 2,5 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% au milieu réactionnel. Après agité et centrifugé à 3000 tours pendant 10 min, on a ajouté 1,25 ml de l'eau et 250µl de 0,1% $FeCl_3$ à 1,25 ml du surnagent. Vc a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en concentration IC50 qui se traduit par la concentration d'antioxydant utilisé pour obtenir une absorbance de 0,5. L'absorbance est déterminée à 700 nm. Les résultats sont comparés avec l'**acide ascorbique (154)**.

VIII. Traitement des animaux :

On a divisé les rats dans 4 groupes de 5 rats chacun et qui sont tous gardé dans des mêmes conditions. Pour le début du traitement soit par l'extrait méthanolique lyophilisé d'*Anethum graveolens* à 200mg/kg le DOX (15mg/kg) pendant 10jours. Et les réstes sont des témoins qui reçoivent l'eau distillée duré 10 jours (durée de traitement)

VIII.1. Les groupes des animaux :

Groupe1 : control ou témoin {que reçoivent quotidiennement par gavage gastrique 10ml/kg d'eau distillée pendant 10 jours}.

Groupe2 : traiter par EMAG par gavage gastrique {ces rats reçoivent chacun une concentration de [200mg/kg/jr] d'EMAG pendant 10 jours}

Groupe3 : traiter par extrait méthanolique et injecter par le doxorubicine {ces rats reçoivent chaque jour l'EMAG avec une concentration 200mg/kg pendant 10 jours et avant les deux derniers jours on injectait par le doxorubicine par la voie intrapéritonéale 15 ml/kg}

Groupe4 : traiter par le doxorubicine {ces rats reçoivent chaque jour par gavage gastrique 10 ml/kg d'eau distillé et une injection intra péritonéale dans les deux derniers jours 15mg/kg}.

VIII.2. Prélèvement sanguin :

Le sang est prélevé au niveau de l'œil par ponction dans le sinus retro-orbital et mis dans des tubes contenant de l'héparine pour prévenir la coagulation. Ces prélèvements sont effectués sur des rats jeunes.

VIII.3. Préparation de la fraction cytosolique de tissus 10% :

Au moment du sacrifice les organes cœur sont récupérés, rincés par l'eau physiologique salin 0.9% puis 1g d'organe est additionné à 9 ml (1v/10v) de solution tampon phosphate 0.1M PH 7.4 contenant du KCl 1.15M. Le mélange est homogénéisé à 1200 tours /minute pendant 10 minutes à 4°C puis à 10000 tours/minute pendant 45 minutes à 4°C. La fraction cytosolique est récupérée et utilisée pour les dosages du taux de malondialdéhyde (MDA), la concentration de glutathion réduit (GSH), et d'enzyme de la catalase (CAT).

IX. Evaluation du MDA et du GSH cardiaque :

Dosage du malondialdéhyde (MDA) dans une fraction cytosolique 10% de cœur.

***Principe :**

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiée par les radicaux libres.

Dans notre études, le taux de MDA cardiaque ont été évalué selon la méthode d'OHKAHAWA et al 1979.le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100C°) entre de MDA et deux thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530nm .extractible par les solvants organiques comme le butanol.

***Méthode de dosage:**

A 0.5ml de la fraction cytosolique 10%(KCl1.15M) du cœur .Nous avons additionné 0.5ml d'acide trichloracétique (TCA20%) et un 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67ml.Lemélange est chauffé à 100C°pendant 18min, refroidis puis additionné de 4ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 min à 3000 tours /min, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophomètre à 530nm. La quantité de MDA dans l'échantillon est exprimée en nm/g du tissu cœur. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec de 1, 1, 3,3-tetraetoxy propane dans les mêmes conditions.

X. Dosage du glutathion réduit cardiaque :

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0.5à 10 mM et de l'ordre du 4 M dans le plasma. Le glutathion se compose de trois amino acides (Figure 17) : l'acide glutamique, la cystéine, est l'acide amino essentiel à la synthèse du glutathion et la plus rare (lahouel, 2005).

Le glutathion se trouve dans la cellule sous de formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité total

***Principe :**

Pour le dosage du glutathion ,la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) et la méthode la plus employée (Ellam,1959).La réaction consisté a couper la molécule d'acide 5.5dithiodis-2-nitrobenzoïque (TNB) lequel à pH(8-9)alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :

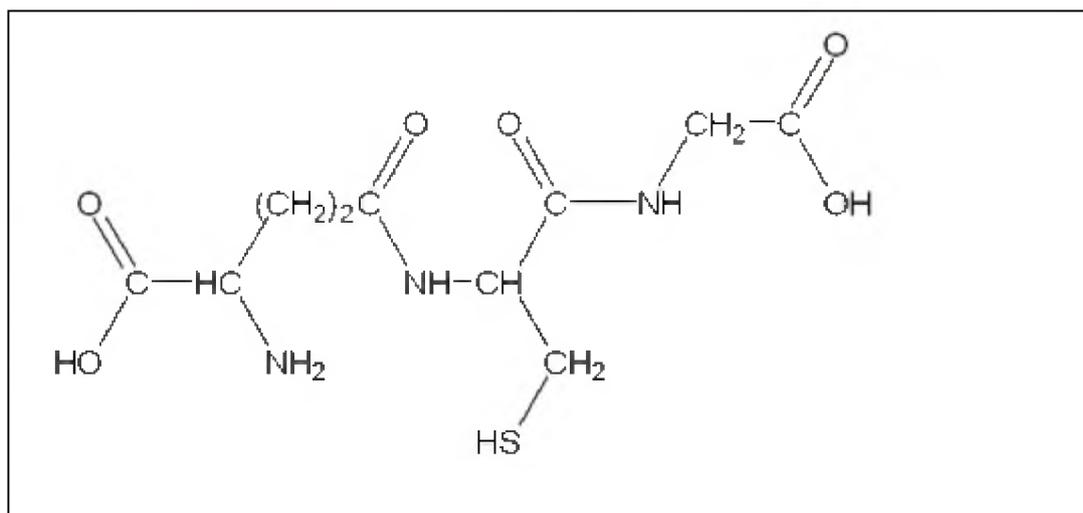


Figure 17 : La formule chimique du la glutathion réduit

***Méthode de dosage :**

A 0.5ml la fraction cytosolique 10% (KC11.15) du cœur, nous avons additionné 0.5ml d'acide trichloracétique (TCA10%) puis centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Ensuite à 1.7ml du tampon phosphate 0.1M, pH : 8.

Nous avons additionné 0.2ml de surnageant et 0.1ml du réactif d'Ellman 0.1M. La lecture de la densité optique est effectuée après ,5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec la TCA10% les concentrations du GSH dans l'échantillon sont exprimées en $\mu\text{m/g}$ de tissu cœur. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du GSH dans les mêmes conditions.

XI. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique :

L'activité de la catalase cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairborne 1985.

***Principe :**

Le principe repose sur la disparition de l' H_2O_2 à 25C° par la présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique.

***Méthode de dosage :**

Le dosage est réalisé dans un volume final de 2.95ml à 3ml d'une solution d'H₂O₂. 19Mm (préparé dans tampon phosphate 0.1M, pH7.4) nous avons additionné 50µl de la fraction cytosolique de l'échantillon.

La réaction est contrôlée par une lecture continuée du changement d'absorbance à 240 nm après chaque minute dans intervalle de temps de deux minutes.

***Calcul :**

L'activité de l'enzyme est exprimée en unité /mg de protéine tissulaire cœur.

$$K=2.303/T \times \log A1/A2$$

K : constant de vitesse de la réaction

T : intervalle de temps

A1 : absorbance dans le temps zéro

A2 : absorbance après une minute

L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante : $U/mg=K/n$

n : mg de protéines en mg présentent dans le volume de l'échantillon utilisé

U/mg de protéine : µmole d'H₂O₂ consommé/min/mg de protéine.

Résultats et Discussion :

Ce travail est fondé sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydants et anti-inflammatoire l'extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de la plante médicinale algérienne des grains d'*Anethumgraveolens*.

I. Le rendement des extraits :

L'extraits aqueux et méthanolique de la plante ont été préparés à partir de la poudre de la partie aérienne des grains d'*Anethium. G*.

Tableau06 :Le rendement d'extraits aqueux et méthanolique de laplante :

Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
EAAG	5.3	13.25
EMAG	14.86	5.87

Le calcule des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (Tableau8) a montré que l'**extrait aqueux d'AG** représente le rendement le plus élevé (**13.25%**), En effet, le rendement n'est pas relatif; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes (**155**).

II. Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques :

Les tests phytochimiques réalisés sur l'extraits aqueux et méthanolique de la plante, sont confirmés par la présence de plusieurs familles de composés, dont les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 07 : Analyse phytochimique préliminaire d'extrait aqueux d'*Anethumgraveolens* :

Composés	EA AG	EM AG
Tanins	+ Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min	+++ Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min
Saponosides (teste 1,2)	++	++
Flavonoïdes	++ Apparition d'une couleur jaune	+++ Apparition d'une couleur jaune
Composés réducteurs	+++ Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert.	+++ Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert.
Coumarines	- -	/
Alcaloïdes sels	++ Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité)	/

Les résultats sont interprétés comme suit: (+) Réaction positive, (±) Trace, (-) Réactions négatives. L'étude phytochimique et d'ET a montré que ces plantes contiennent: des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des coumarines, des composés réducteurs, et des alcaloïdes sels. La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer leurs

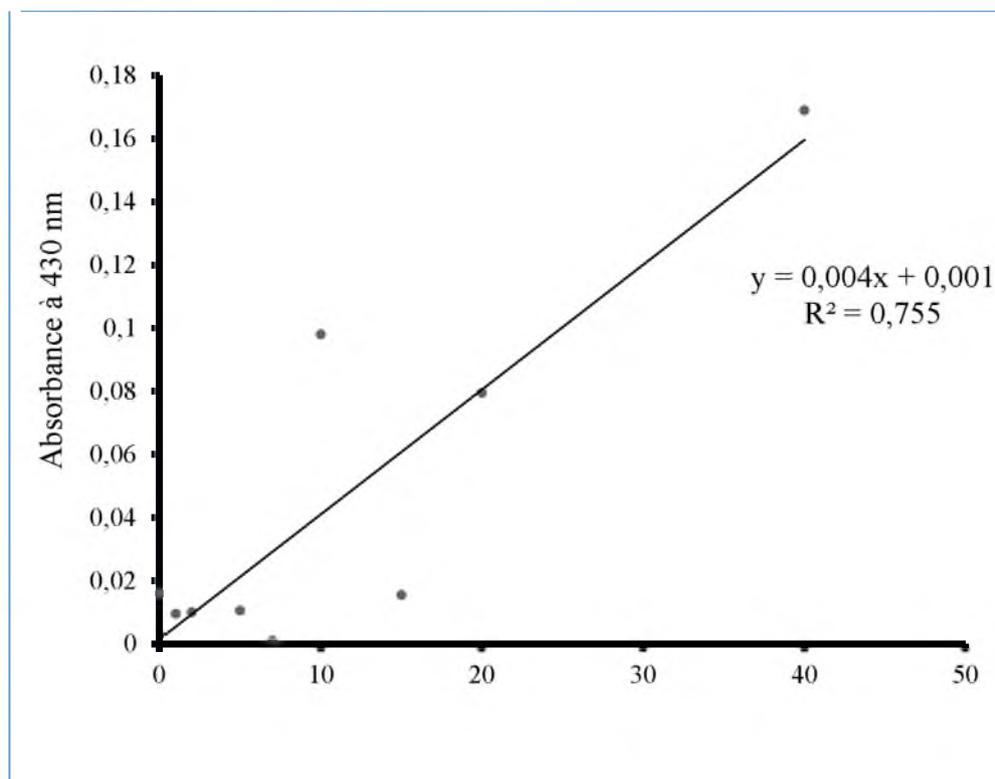
utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies telles que: la Fièvre, contre les infections, etc....(155).

III. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes :

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (156). Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes est dû à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits a été effectué pour en estimer les teneurs.

IV. Dosage des flavonoïdes :

L'étude quantitative des extraits aqueux au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avait pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (Figure 18) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentrations. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (Figure 18) et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$.



Concentration de quercétine

Figure 18 : Courbes d'étalonnage de la quercétine

Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3)

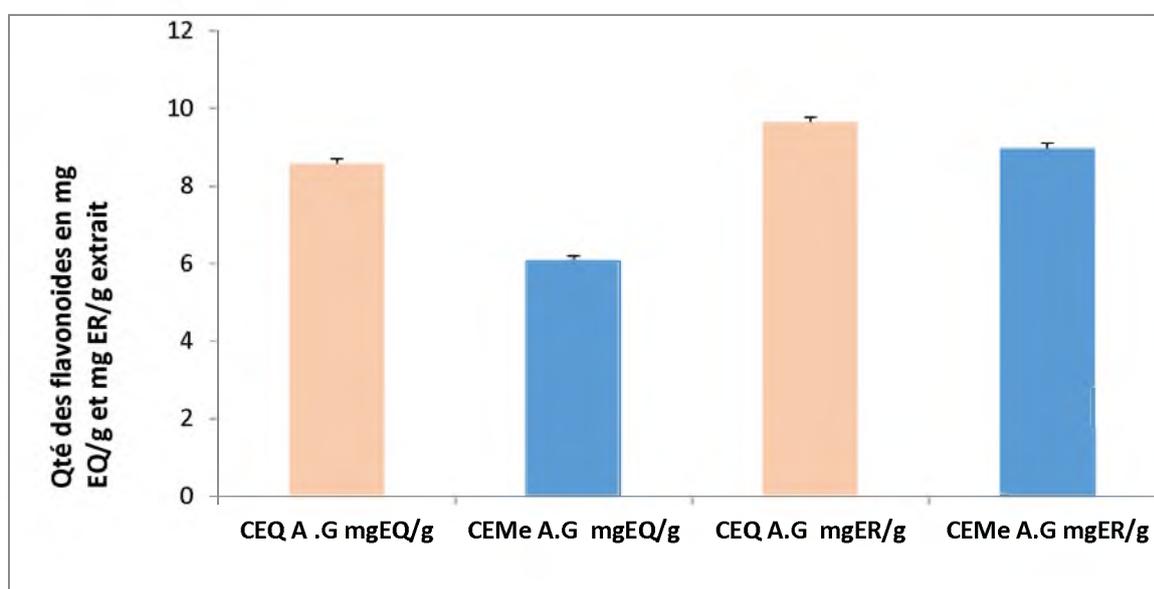


Figure 19 : La quantité des flavonoïdes en mg EQ/g et en mg ER/g extrait

Suivant la figure ci-dessus, les teneurs en flavonoïdes, exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait

. L'extrait EAAG représente la teneur la plus élevée, tandis que la teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait EMAG.

. Dosage des composés phénoliques totaux :

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations.

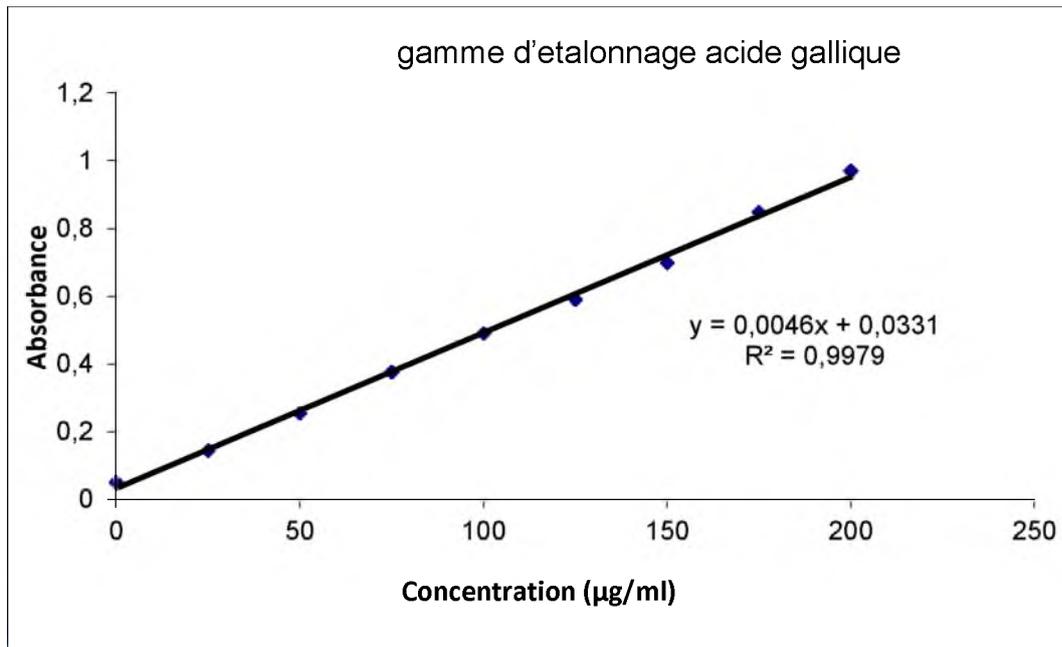


Figure20 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point de la courbe représente la moyenne ± SEM (n = 3).

Les polyphénols totaux dans cet extrait sont dosés selon la méthode de bleu de Prusse modifiée par(156).

La teneur en composés phénoliques d'extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par 100 gramme de la matière sèche, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 760 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans le graphe suivant :

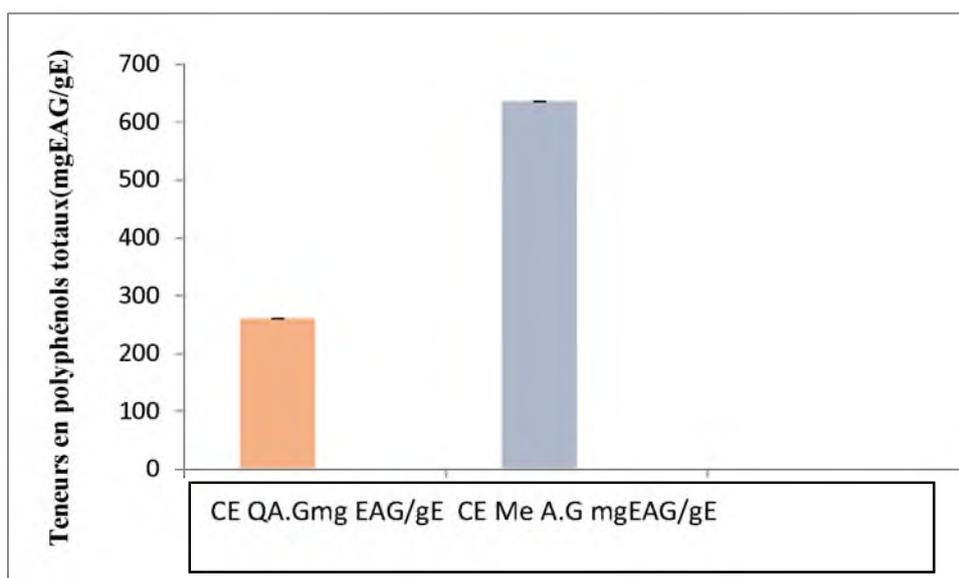


Figure 21 :Quantité des phénols totaux l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique d'acide galique

On peut remarquer, d'après les résultats des phénols totaux des différents extraits (figure 18) que l'extrait méthanolique de *Anethium.G* est celui qui en contient le taux le plus élevé avec Suiwi par l'extrait aqueux *Anethium.G*. L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols. , le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (157,158) Le pouvoir réducteur des extraits des plantes sont des doses dépendantes (concentrations dépendantes). Le pouvoir réducteur des espèces étudiées est probablement dû à la présence de groupement, hydroxyle (OH^-) dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (159). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (160, 161,162).

V. Test in vitro de l'activité antioxydante :

V.1. Balayage radical hydroxyle sur l'activité de l'extrait Méthanolique et aqueux :

La méthode de Piégeage du radical hydroxyle adoptée dans cette étude est celle de **Zhong et al. (2010), (190)**; avec peu modification.

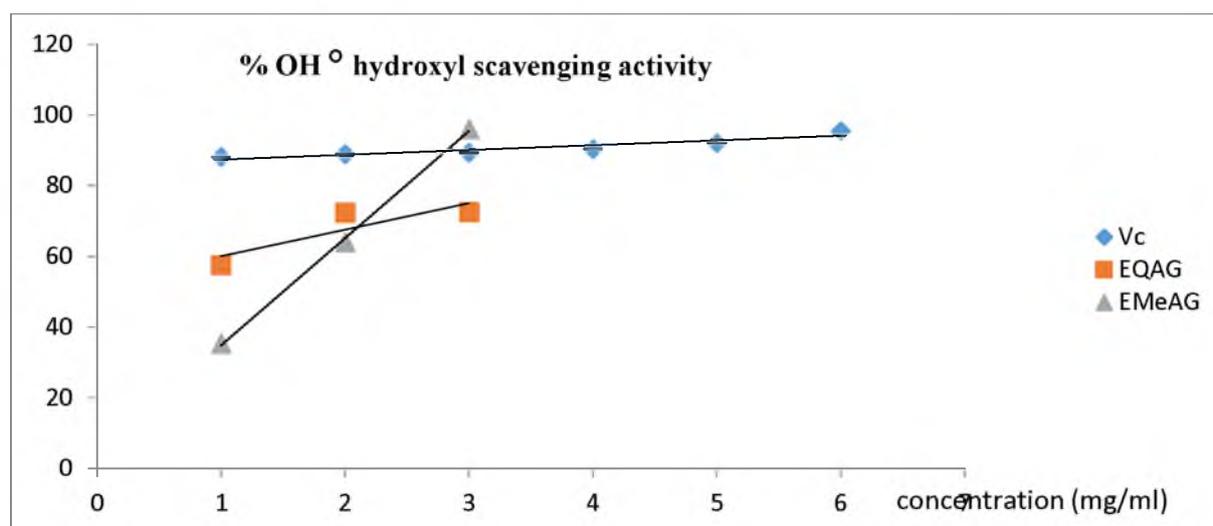


Figure 22 : Piégeage du radical hydroxyle des extraits aqueux, méthanolique et Vc

Le radical hydroxyle, est le plus connu réactif, qui peut attaquer et faire des dommages à certain bio-macromolécule dans les cellules vivantes. Les dommages biologiques causés par les radicaux hydroxyles et ses capacités de la stimulation peroxydase des lipides. Les chaînes gras latérales d'acide phospholipides membranaires (Valko et al.,2007)(188). Comme le montre la Figure 22, les activités de piégeage de l'extrait méthanolique, et Vc augmente avec l'augmentation des concentrations. A la concentration de 0,5 mg / ml, l'activité de piégeage pour l'extrait méthanolique, l'extrait aqueux et le Vc était de 35,42%, 57,61% et 95,52%, respectivement. Plus, Ces résultats montrent que le Vc a une bonne activité de piégeage des radicaux hydroxyles par rapport à les deux extraits méthanolique et aqueux. L'extrait aqueux d'*Anethium.G* a donné un piègeur desradicaux hydroxyles supérieurs à l'activité de l'extrait méthanoliqued'*Anethium.G*.

V.2. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux et méthanolique par la méthode de DPPH (effet scavenger) :

L'activité antioxydante des deux extraits d'AG (aqueux et méthanolique) *vis-à-vis* du radical DPPH à été évaluée par le spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (Figure23) la cinétique de décoloration de ce radicale a été suivie après addition de 50 µl de chacune des concentrations d'EAAG et EMAG.

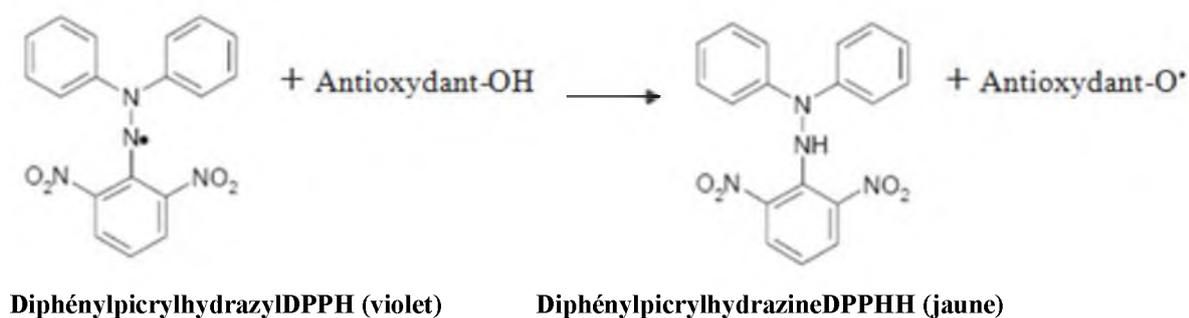


Figure 24 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

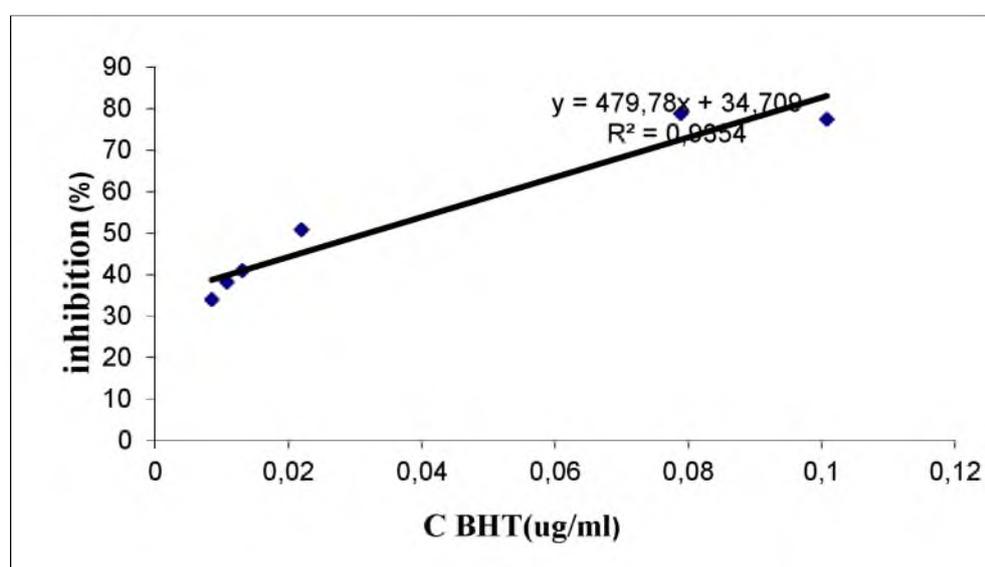


Figure 25 : pourcentage d'inhibition de BHT

Inhibition *d'anethumgravéolens* 1% :

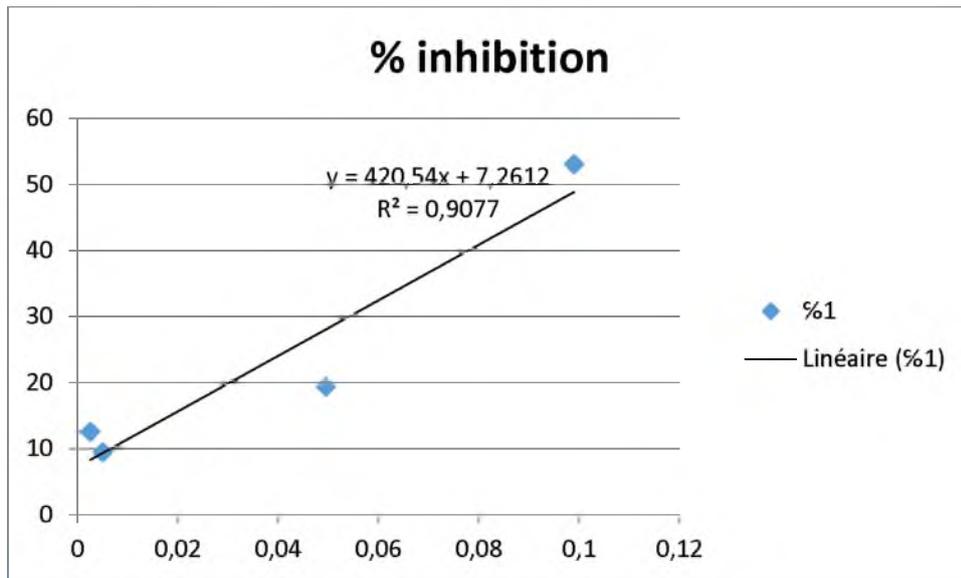


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait méthanolique d'AG 1%

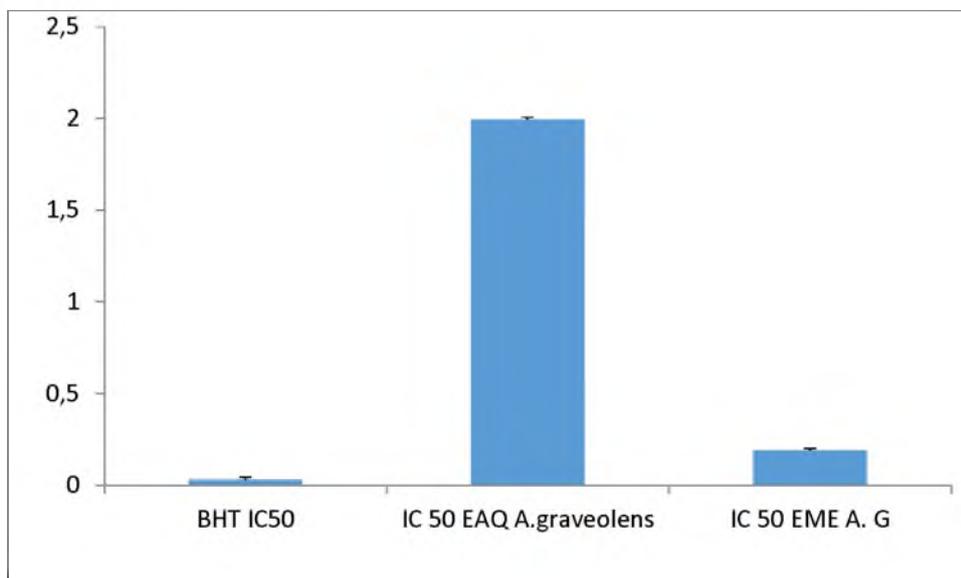


Figure 27 : La concentration des deux extraits et de BHT qui inhibent 50 % du radical DPPH Les valeurs représentent la moyenne de deux essais ± SD radical DPPH Les valeurs représentent la moyenne des deux essais ± SD.

Les profils d'activité anti radicalaire obtenus (**Figure 27**) montre que les extraits possèdent une activité anti radicalaire dépend à la dose, exprimé par les concentrations d'extraits et standards qui piègent 50 % du radical DPPH (IC₅₀) (**Figure 27**). Le DPPH est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (**163, 164, 165**).

L'extrait méthanolique de *l'Anethium.G* possède l'effet scavenger le plus puissant suivi par L'extrait aqueux *d'Anethium.G* Comparant avec le BHT. Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (**166, 167, 168**). Il a été trouvé que l'acide ascorbique, l'alfa-tocophérol, les tannins et les flavonoïdes provoquent la réduction et la décoloration du radical libre diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) en lui donnant un hydrogène pour former le diphénylpicrylhydrazine (DPPH) (**Figure 19**) (**169,170**).

Tableau 08: Les concentrations des composés phénoliques qui inhibent 50 % du radical DPPH

Echantillons	IC ₅₀ (ug/ml)
Rétine	4,25 ± 0,18
Quercétine	3,22 ± 0,02
Acide gallique	0,58 ± 0,01

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'EMAG, qui représente la fraction la plus riche en polyphénols, possède l'effet scavenger le plus puissant par rapport aux autres extraits (**figure 28**). Les composés phénoliques (acide gallique, quercétine et rutine) **Tableau 08** possèdent une activité anti-radicalaire très élevée et supérieure à celle du BHT. Le plus actif est l'acide gallique avec une IC₅₀ d'environ $0.58 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$, ensuite la quercétine et la rutine qui ont des IC₅₀ de 3.22 ± 0.029 et $4.25 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$, respectivement. l'extrait éthanolique est capable de piéger le radical DPPH de manière dose dépendante, Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (**171, 172, 173**); Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres (**174**), en

particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy(175). Le nombre et/ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité anti-oxydante des flavonoïdes **Figure28 (175)**.

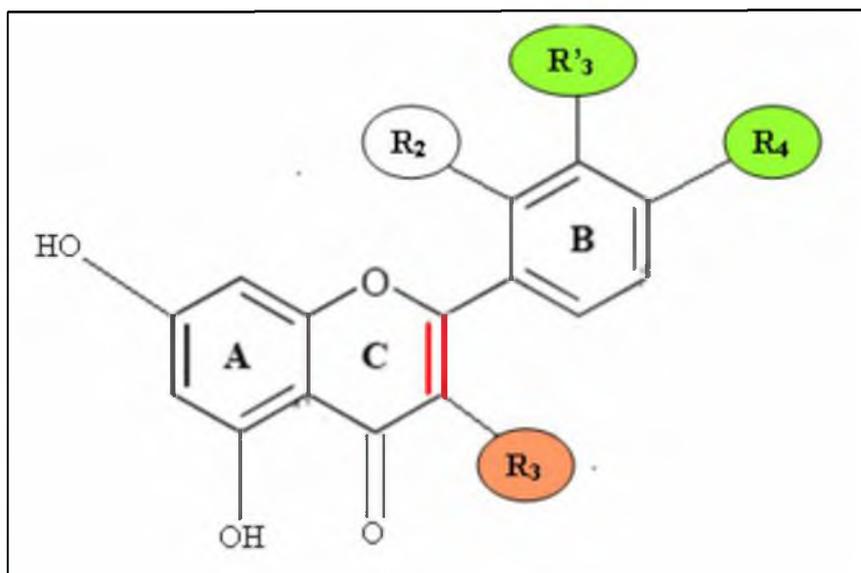


Figure 28: Principaux éléments de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.

V.3.Réducing power :

Ce test est basé principalement sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur(153).

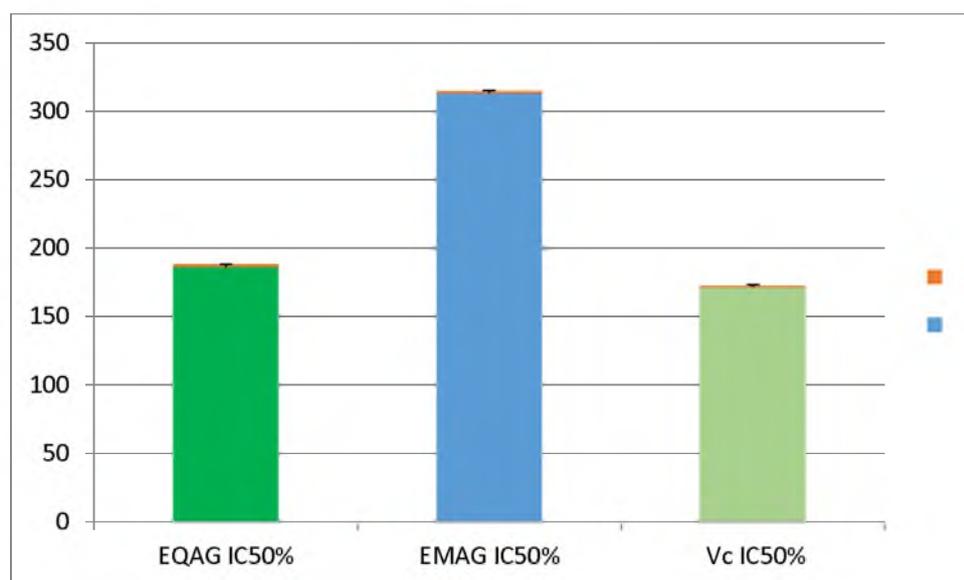


Figure 29 : Pourcentage de pouvoir réducteur d'extrait aqueux, méthanolique et Vc

Cette figure montre que notre extrait aqueux d'*Anethium Graveolens* à une concentration inhibitrice (IC50) proche à l'IC50 de Vc prouve que l'*Anethium.Ga* un effet anti radicalaire élevé par rapport à l'extrait méthanolique

VI. Activité anti-inflammatoire *in vitro* :

Le tableau 09 montre que les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait aqueux d'*Anethium.G* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de Bovine sérum albumine (BSA).

Tableau09 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à la concentration

De 250 µg/ml :

Les Echantillons	% d'inhibition de la dénaturation des protéines
Diclofenac sodium	78.60±2.19

EAAG	91.69±9.99
EMAG	90.32±9.59

D'après les résultats du tableau, les deux extraits étudiés inhibent la dénaturation de BSA à la concentration de 250 µg/ml.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation l'EAAG et EMAG. On constate que l'EAAG était plus efficace que l'EMAG avec une différence de 1.37%. Les résultats obtenus pour ces extraits sont comparables à ceux obtenus pour le diclofenac sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce un pourcentage d'inhibition 0 la même concentration.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (176,177, 178). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (176,173).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme lephénylbutazone et L'indomethazine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (179).

D'après les résultats, on constate que les deux extraits sont capables de contrôlé la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines.

L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins dans les deux extraits trouvés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines (180, 181, 182, 183).

VII. Peroxydation des lipides :

-Test 1 : Inhibition de la peroxydation des lipides a été déterminé par dosage de l'acide thiobarbiturique-substances réactives (TBARS) en utilisant l'homogénat foie des rats comme une source riche en lipide.

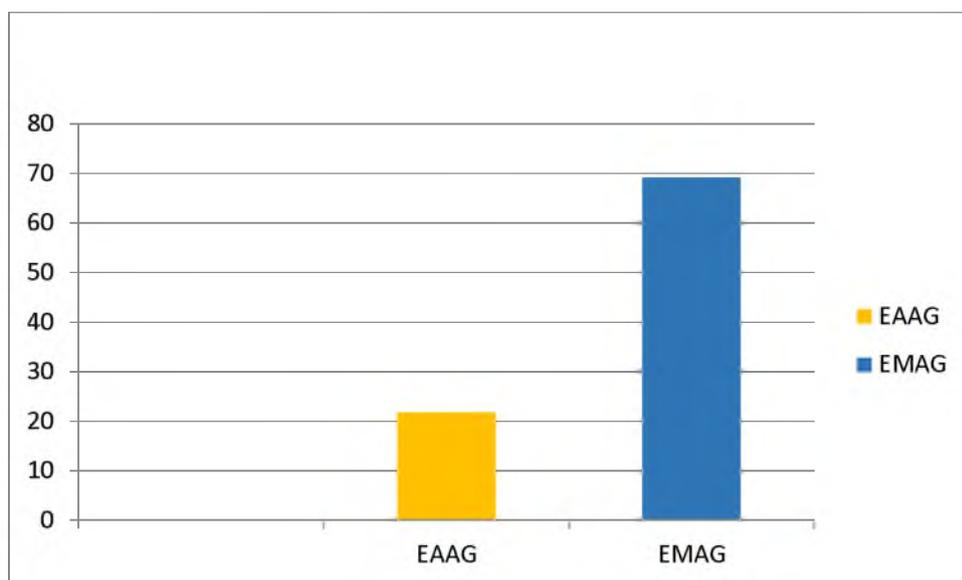


Figure 30: Pourcentage d'inhibition de l'EAAG et EMAG du test lipide peroxydase d'homogénat

D'après les résultats montrés dans la figure 30 que l'EAAG et EMAG possèdent un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, D'après ces résultats on a trouvé que l'EMAG a un effet inhibiteur plus puissant que l'EAAG.

-Test 2 : Selon la méthode de (Wong, Hashimoto, et Shibamoto, 1995).

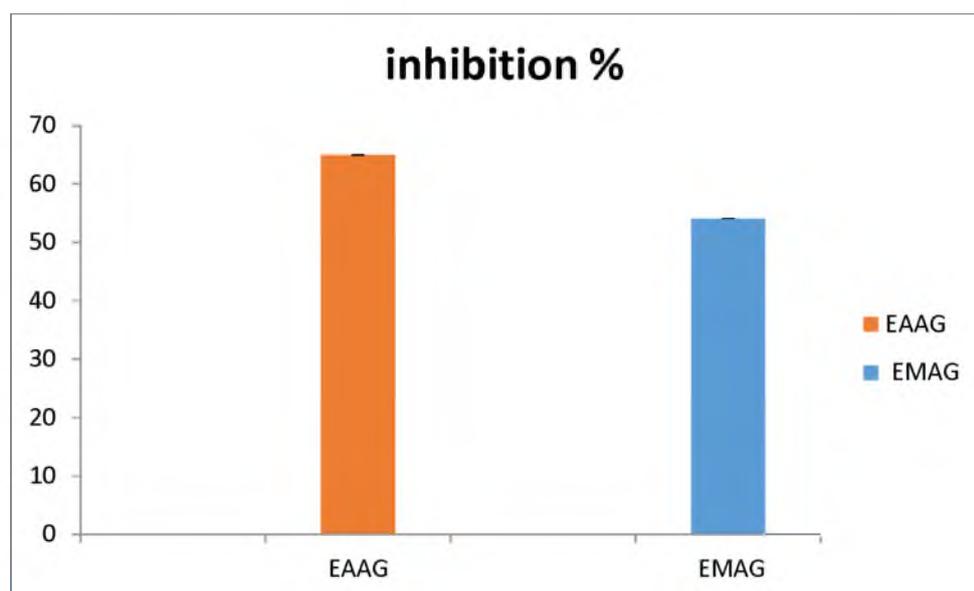


Figure 31: Pourcentage d'inhibition de l'EAAG et EMAG du test peroxydation lipidique du Jaune d'œuf

D'après les résultats montrés dans la figure (31) que l'EAAG et EMAG possèdent un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, respectivement. D'après ces résultats on a trouvé que l'extrait aqueux a un effet inhibiteur plus puissant que l'EMAG.

*Dans le test peroxydation lipidique d'homogénat on a trouvé que l'EMAG a un effet inhibiteur puissant que l'EAAG, par contre dans le jaune d'œuf on a trouvé que l'EAAG est le plus puissant.

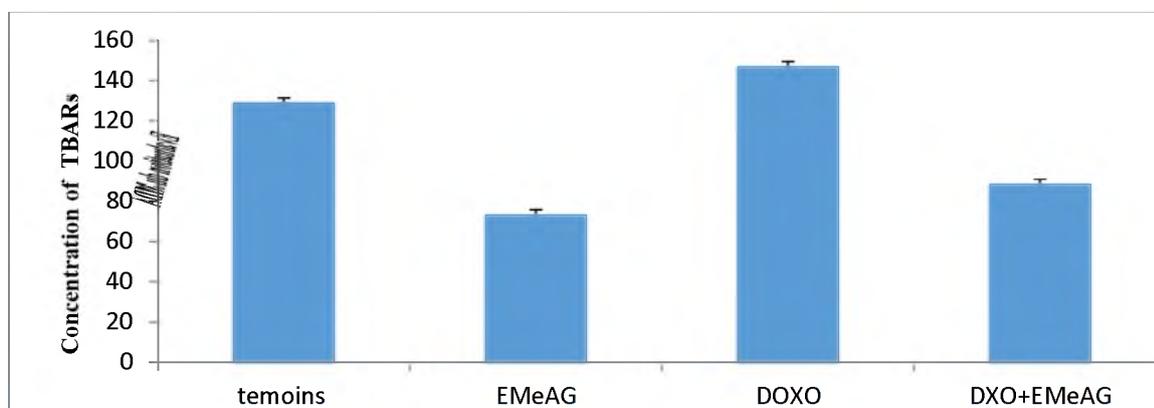
VIII. Evaluation du MDA cardiaque:

Figure 32: Evaluation du MDA cardiaque dans l'extrait méthanolique par rapport au DOX

Le niveau élevé des produits finaux de la peroxydation lipidique le TBARs, dans le tissu cardiaque est un des indicateurs importants endommagements de tissus et de rupture des mécanismes de défense antioxydants qui prévenir la formation de radicaux libres.

Les résultats sont montré qu'il ya une augmentation excessifs des TBARs chez des rats traitait par le Doxorubicine a une dose de 15 mg/ml par 146,98 ± 3,51 umol TBARs /g tissu, et une baisse de la concentration de ces constituants dans le tissu cardiaque chez les rats traitait par Doxo plus extrait par 88,46 ± 2,43 umol/g tissu et l'extrait seul EMeAG (200mg/kg) par 73,46 ± 6,53 umol/g tissu lorsque on comparent ces résultats avec le lot témoin avec une concentration de 128,95 ± 8,07 umol/g tissu.

IX. Evaluation du GSH cardiaque:

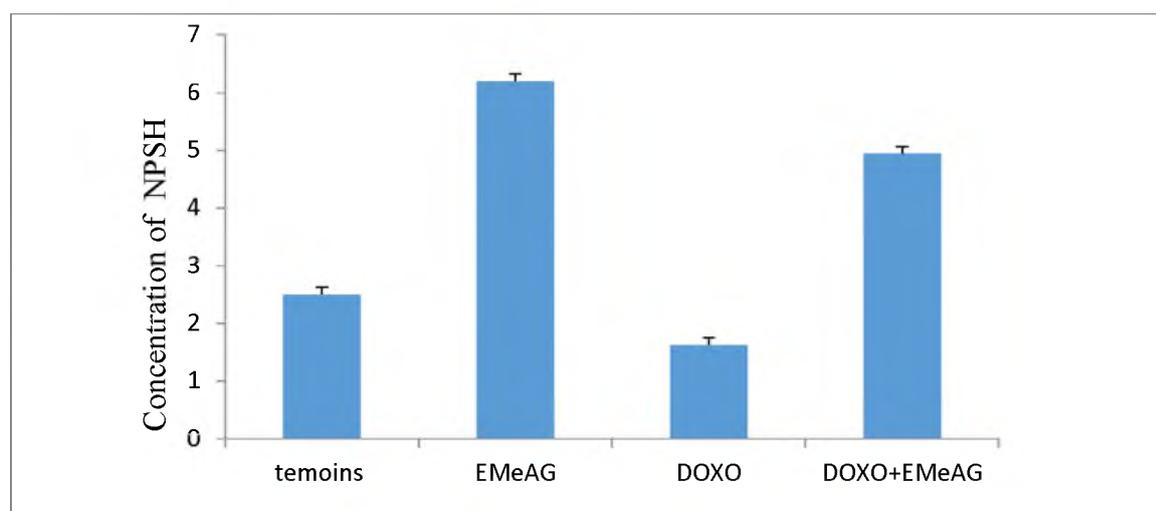


Figure 33: Evaluation du GSH cardiaque dans l'extrait méthanolique par rapport au DOX

Le GSH est le principal thiol non protéique dans les organismes vivants qu'éliminent les espèces des radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène, et le radical superoxyde et maintient les thiols protéiques membranaires épuisés dans les mitochondries cardiaques pendant les lésions dues à des toxines comme le Doxorubicine.

Les résultats montrent que les niveaux de GSH étaient démunies chez le groupe de Doxorubicine traité ($1,63 \pm 0,11 \mu\text{mol/g}$ tissu) par contre on a remarquées L'augmentation des niveaux de glutathion dans les groupes traités avec EMeAG par le Doxo et EMeAG, qui révèlent son capacité à réduire le stress oxydatif.

Alors nos études ont montré que le traitement des animaux avec EMeAG considérablement restauré les activités enzymatiques métaboliques à cette dose 200mg/kg qui indique qu'il améliore les fonctions physiologiques dans les tissus du cœur. C'est également soutenu par la régulation des niveaux d'activités des enzymes antioxydants.

X. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique :

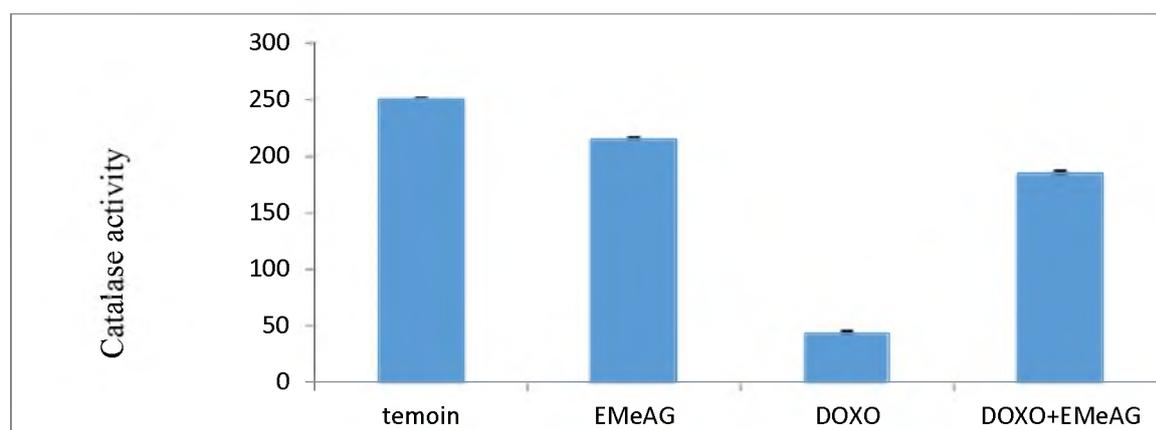


Figure 34: Dosage de l'activité de la catalase cytosolyque dans l'extrait méthanolique par rapport au DOX.

Le catalase est un antioxydant enzymatique qui protège les tissus contre les radicaux hydroxyles hautement réactifs par conversion du peroxyde d'hydrogène en oxygène nuisibles dans l'eau, et La réduction de l'activité de cette enzyme peut induire un stress oxydatif dans les cellules en raison de l'accumulation de métabolites toxiques comme les radicaux superoxydes et peroxyde d'hydrogène comme la montré notre résultats une chute d'activité d'enzyme de CAT en raison d'administration de doxorubicine. Lorsque on compare cette activité par l'activité de lot témoin

Tandis que nos résultats ont montrés une augmentation de l'activité de la catalase chez l'animaux traitait par extrait seule EMeAG et on co-administration avec DOX

Conclusion générale :

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, ce qui nous amène à la conservation de la biodiversité végétale locale.

Et comme la phytothérapie suscite un renouveau d'intérêt, nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet de l'extrait phénolique de la plante médicinale algérienne *Anethium.G* et son activité antioxydante, anti-inflammatoire et leur effet cardioprotecteur contre la toxicité du doxorubicine.

La toxicité cardiaque des anthracyclines a été initialement étudiée dans les années 1970, sa prévention a toujours été centrée sur le monitoring de la fonction cardiaque en cours de traitement. Cependant, un consensus sur la façon optimale de monitorer un patient n'est pas encore acquis en 2009.

DOX est l'un des médicaments anticancéreux le plus efficaces dans le traitement du cancer. Son mode d'action exact est cependant mal connu et est le sujet d'intenses recherches. Il est connu que le DOX peut s'insérer entre deux paires de bases azotées d'ADN ce qui inhibe l'activité de la topoisomérase II. Le métabolisme du DOX entraînerait également la formation de radicaux libres qui endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires.

La prévention ou le contrôle du stress oxydant par un traitement antioxydant fait partie de la stratégie thérapeutique actuelle. Donc pour éviter la toxicité de DOX il faut administrer quelques agents supplémentaires comme les antioxydants qui inhibent directement la formation des radicaux libres, de la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion. La prévention ou le contrôle du stress oxydant par un traitement antioxydant fait partie de la stratégie thérapeutique actuelle.

Le but principal de notre étude est d'évaluer les propriétés antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale algérienne *Anethium.G* et de montrer qu'elle a un effet protecteur contre le DOX.

Dans la première partie, nous avons évalué la quantité des phénols totaux en adoptant la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992), en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Et les résultats montrent que la plante étudiée est riche en ces composés, avec une teneur dans l'extrait méthanolique $636.14 \pm 0,002$ mgEAG/gE; Et dans l'extrait aqueux 260.24 ± 0.18 mgEAG/gE respectivement.

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés à étudier l'activité antioxydante des extraits de plantes dans le but de connaître leurs capacités antioxydante, anti-inflammatoire et leurs pouvoirs inhibiteurs la toxicité du DOX.

L'activité anti-inflammatoire in vitro d'extrait méthanolique d'*Anethum.G* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines présentent les pourcentages d'inhibition des deux extraits (méthanolique et aqueux) 91.69 ± 9.99 , 90.32 ± 9.59 respectivement.

L'activité antioxydante des deux extraits d'AG (aqueux et méthanolique) a été évaluée par le spectrophotomètre en suivant la réduction du radical DPPH qui a été confirmé par les méthodes non enzymatiques. L'EAAG et l'EMAG possèdent un effet scavenger sur le radical DPPH élevé avec un IC50 de $1,99 \pm 0,01$ mg / ml et $0,19 \pm 0,01$ mg / ml respectivement.

On a fait d'

autres tests tel que le taux de MDA cardiaque ont été évalués selon la méthode d'OHKAWA et al 1979. Dont les résultats (DOX= $146,98 \pm 3,51$, DOX+l'extrait= $88,46 \pm 2,43$) sont montrés que notre plante a donné un bon effet contre les radicaux libres qui sont formés par le DOX, le GSH selon la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) et la méthode la plus employée (Ellam, 1959). Dont les résultats (DOX= $1,63 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/g}$, DOX+E MAG= $4,94 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/g}$) sont montrés que le GSH a une capacité à réduire le stress oxydatif, et en fin l'activité de la catalase cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairborne 1985, dont les résultats sont (DOX= $185,6 \pm 2,2$ $\dot{\text{U}}/\text{mg}$, DOX+EMeAG= $215,61 \pm 3,33$ $\dot{\text{U}}/\text{mg}$) ; sont montrés une augmentation de l'activité de la catalase qui confirme que notre plante a un effet bénéfique contre les radicaux hydroxyle.

Notre étude est montrée que la plante médicinale *Anethium.G* présente une bonne activité antioxydante et anti-inflammatoire qui pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique et surtout dans les traitements anticancéreux.

Résumé :

Notre étude est fondé sur les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait brut et méthanolique de *Anethium.G* ont été évalué par différentes méthodes (DPPH, lipide peroxydase, Radical hydroxyle, reducing power, phytochimique, flavonoïdes, polyphénols, CAT, GSH, et MDA).

Le stress oxydant, cause de plusieurs maladies, suscite la recherche de nouveaux remèdes antioxydants. Dans cette optique, l'étude de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de la plante utilisées dans la pharmacopée algérienne (*Anethium.G*). L'estimation quantitative des composés phénolique totaux par la méthode spectrophotométrique a montré que les extraits *d'Anethium.G* sont riches en flavonoïdes et en tannins. L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode du piégeage des radicaux libres a montré que les extraits (méthanolique et aqueux *d'Anethium.G*) étudiés ont tous une très bonne activité réductrice, surtout pour l'extrait méthanolique ayant présenté des pourcentages d'inhibition égale à 91.69 ± 9.99 , 90.32 ± 9.59 respectivement, avec des IC₅₀ égale à $1,99 \pm 0,01$ mg/ml et $0,19 \pm 0,01$ mg/ml respectivement. L'évaluation du MDA cardiaque selon la méthode d'OHKAHAWA et al 1979 et le GSH cardiaque selon la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman 1959. Dont les résultats sont les suivants : (DOX seul $146,98 \pm 3,51$, co-traitement avec le DOX $88,46 \pm 2,43$) (DOX seul $1,63 \pm 0,11$ μmol/g, co-traitement avec le DOX $4,94 \pm 0,13$ μmol/g) respectivement, et l'activité de CAT cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairborne 1985, avec les résultats suivantes : (DOX seul $185,6 \pm 2,2$ U/mg, co-traitement avec le DOX $215,61 \pm 3,33$ U/mg). Ces derniers montrent que notre plante *Anethium Graveolens* a un effet antiradicalaire aussi capable de réduire le stress oxydatif, par l'augmentation de l'activité de la catalase confirmé par notre étude

Ces résultats obtenus suggèrent que cette plante peut être utilisée pour traiter les maladies et l'inflammation qui nécessitent le piégeage des radicaux libres.

Mots clés : *Anethium.G*, activité antioxydante, radicaux libres, phénols, flavonoïdes, flavanones, anti- inflammation, DPPH, CAT, GSH, MDA, et stresse oxydative.

Abstract:

Our study is concerned by the Antioxidant activities and anti-inflammatory of the crude extract and the methanolic *Anethium.G* were evaluated by different methods (DPPH, lipid peroxidase, CAT, GSH, BSA, and MDA).

Oxidative stress causes several diseases, raises the search for new cures antioxidants. In this context, the study of the antioxidant activity of methanolic and aqueous extracts of the plant used in the Algerian pharmacopeia was performed. The plant extract is obtained by the drying. The quantitative estimation flavonoids, flavanones and total phenols by the spectrophotometric method has shown that these extracts contain these compounds. The evaluation of the antioxidant power by the method of free radical scavenging showed that extracts (aqueous and methanoic *Anethum.G*) studied all have a very good reducing activity, especially for the methanol extract have submitted percentages inhibition equal to 91.69 ± 9.99 , with IC50 equal to 1.99 ± 0.01 mg / ml.

The evaluation of MDA cardiaque by the method of OHKAWA and al 1979 and the GSH cardiaque by colorimétrique method by the réactif of Ellman 1959. In the results there is: (DOX alone $146,98 \pm 3.51$, co-treatment with the DOX 88.46 ± 2.43) (DOX alone 1.63 ± 0.11 umol/g, co-treatment with DOX 4.94 ± 0.13 umol/g) respectively, and then activity of CAT cytosolique is determinate by the method of Clairborne 1985, with this result: (DOX alone 185.6 ± 2.2 u/mg, co-treatment with the DOX 215.61 ± 3.33 u/mg). This last show that our plant *Anethium graveolens* have an effect antiradical also capable depends the oxydatif stress, through the augmentation of the catalase activity confirmed by our study.

These results suggest that the plant can be used to treat diseases and inflammation which require the free radical scavenging.

Keywords: *Anethium Graveolens*, antioxidant activity, free radicals, phenols, flavonoids, flavanones, anti-inflammation, DPPH, CAT, CSH, BSA, M DA Doxorubicine, cardiotoxicité.

المخلص

الهدف من خلال هذه الدراسة وتقدير النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للالتهاب بمستخلصين مائي و ميثالوني لنبته الشبت *Anethium.G* وذلك من خلال اجراء عدة تجارب مخبرية (ما فوق الاكسدة الليبيدية وقدرة المستخلصين على جذر ال DPPH، وتثبيط النشاط جذر ال OH وذلك لدراسة الخاصية الارجاعية Reducing power وتحديد المركبات الاساسية من خلال الدراسة الفيتوكيميائية لهذه النبتة وذلك من خلال تقدير كمية الفلافونويد ومركبات عديدة الفينول واخيرا تم تقدير نشاط انزيم CAT وتقدير كمية MDA و GSH وذلك في نسيج القلب.

كما نعلم أن الاجهاد التأكسدي بسبب العديد من الامراض مما دفعنا الى البحث عن مستخلصات جيدة ذات خاصية ضد جذرية وهذا هو الهدف من دراستنا لهذه النبتة الجزائرية AG بمستخلصيها المائي و الميثانولي الذي تحصلنا عليه من خلال تجفيف العصارة النباتية المائية و الميثانولية.

التقدير الكمي لعديدات الفينول الكلية تم من خلال الاستعمال جهاز المطياف الضوئي والذي أظهرت نتائجه غنى المستخلص بالفلافونويدات والتانين، كما اظهرت الدراسة الارجاعية لجذر ال DPPH قدرة إرجاعيه هامة لكلا المستخلصين خاصة المستخلص الميثانولي وذلك بقدرة تثبيط 9.99 ± 19.69 وقيمة $IC_{50} = 1.99 \pm 0.01$ ان تقدير كمية ال MDA القلبي من خلال طريقة OHKAWA 1979 وتقدير GSH من خلال الطريقة اللونية وكاشف ELLMAN 1959 أظهرت النتائج الموالية: (DOX وحده 3.51 ± 146.98 مع مستخلص النبتة + 2.43 ± 88.46 DOX) و dox وحده (0.11 ± 1.63 U/mg ومستخلص النبتة + 4.94 ± 0.13 U/mg) على الترتيب.

أما التقدير نشاط الانزيم CAT السيتوزولي حسب طريقة CLAIRBORNE 1985 أظهرت النتائج: و dox وحده (2.2 ± 185.6 U/mg ومستخلص النبتة + 3.33 ± 215.61 DOX U/mg) هذه النتائج المتحصل عليها أثبتت قدرة المستخلص النباتي ضد الجذرية وقدرتها على خفض الاجهاد التأكسدي وذلك من خلال رفع قيمة نشاط الانزيم ال CAT و GSH وخفض كمية ال MDA كما اظهرتها دراستنا.

هذه الدراسة يمكنها اقتراح استعمال هذه النبتة في علاج أمراض الالتهابات التي تستدعي قضاء على الجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية :

Anethium.G ، النشاط المضاد للأكسدة، الجذور الحرة، الفينولات، فلافونويدات، مضاد الالتهاب، جذر DPPH، انزيم ال CAT، GSH، MDA، اجهاد تأكسدي، Cardiotoxicité، Doxorubicine .

Nom et prenom : Haioun Amina	DATE DE SOUTENENCE
Nom et prenom : Hamoudi Fatima Zohra	15/06/2015
Titre : Activité antioxydante de la plante médicinale Algérienne Anethiumgraveolens et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité de la doxorubicine	
NATURE DE MASTER : Master en physiotoxicologie	
OPTION : Toxicologie et Santé	
Résumé :	
<p>Notre étude est fondé sur les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait brut et méthanolique de <i>Anethium.G</i> ont été évalué par différentes méthodes (DPPH, lipide peroxydase, Radical hydroxyle, reducing power, phytochimique, flavonoïdes, polyphénols, CAT, GSH, et MDA).</p> <p>Le stress oxydant, cause de plusieurs maladies, suscite la recherche de nouveaux remèdes antioxydants. Dans cette optique, l'étude de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de la plante utilisées dans la pharmacopée algérienne (<i>Anethium.G</i>). L'estimation quantitative des composés phénolique totaux par la méthode spectrophotométrique a montré que les extraits d'<i>Anethium.G</i> sont riches en flavonoïdes et en tannins. L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode du piégeage des radicaux libres a montré que les extraits (méthanolique et aqueux d'<i>Anethum.G</i>) étudiés ont tous une très bonne activité réductrice, surtout pour l'extrait méthanolique ayant présenté des pourcentages d'inhibition égale à 91.69 ± 9.99, 90.32 ± 9.59 respectivement, avec des IC50 égale à $1,99 \pm 0,01$ mg/ml et $0,19 \pm 0,01$ mg/ml respectivement. L'évaluation du MDA cardiaque selon la méthode d'OHKAHAWA et al 1979 et le GSH cardiaque selon la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman 1959. Dont les résultats sont les suivants : (DOX seul $146,98 \pm 3,51$, co-traitement avec le DOX $88,46 \pm 2,43$) (DOX seul $1,63 \pm 0,11$ umol/g, co-traitement avec le DOX $4,94 \pm 0,13$ umol/g) respectivement, et l'activité de CAT cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairborne 1985, avec les résultats suivantes : (DOX seul $185,6 \pm 2,2$ U/mg, co-traitement avec le DOX $215,61 \pm 3,33$ U/mg). Ces derniers montrent que notre plante <i>AnethiumGraveolens</i> a un effet antiradicalaire aussi capable de réduire le stress oxydatif, par l'augmentation de l'activité de la catalase confirmé par notre étude</p> <p>Ces résultats obtenus suggèrent que cette plante peut être utilisée pour traiter les maladies et l'inflammation qui nécessitent le piégeage des radicaux libres.</p>	
Mots clés : <i>Anethium.G</i> , activité antioxydante, radicaux libres, phénols, flavonoïdes, flavanones, anti-inflammation, DPPH, CAT, GSH, MDA, et stress oxydative.	
LABORATOIRE DE RECHERCHE : Laboratoire de biologie faculté de science de la nature et de la vie, Université frères Mentouri Constantine	
PRESIDENT DE JURE : LalaouiKoreichi (Pr. U.F.M.C)	
Rapporteur : IhoualSafia(MA.U.F.M.C)	
Rapporteurs : Boubekri Nassima(MC. U.F.M.C)	
Rapporteurs : Boulkandoul Ramzi (MA. U.F.M.C)	