



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 عاوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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*

Intitulé :

Les polyphénols de l'extrait *n*-butanol d'une plante médicinale de la famille des Rosacées: Evaluation de leur pouvoir antioxydant et protecteur vis-à-vis la toxicité de la doxorubicine.

Présenté et soutenu par : Amedjoudj Nour El Houda

Le : 01 /07/2017

Bounab Romaïssa

Menzer Meriem

Président du jury : Zama Djamila (Pr- UFM Constantine).

Rapporteur : Amrani Amel (MCA- UFM Constantine).

Examineurs : Boulkandoul Ramzi (MAA- UFM Constantine).

Tour Hanifa (MAA- UFM Constantine).

***Année universitaire
2016- 2017***

Remerciements

*Le jour qu'on a attendu avec impatience est venu après plusieurs années d'apprentissage, c'est le jour de notre fin d'études, un jour qui ne ressemble pas aux autres, il doit être remplis de moments dont nous nous souviendrons longtemps. Et comme on dit « **une belle récompense pour une belle patience** ». Pendant ces cinq années, on s'est battu avec toute sorte de défis pour pouvoir atteindre notre objectif de réussite. A cette heureuse occasion, on adresse nos remerciements à priori à notre dieu Allah qui nous protège et qui avec son accord et sa grâce nous finirons **gagnantes et récompensées**.*

A notre encadreur Mme Amrani, A, maître de conférence à l'université Mentouri de Constantine à la faculté des sciences de la nature et de la vie pour son attention , on est très ravies d'avoir travaillées en sa compagnie car sans son appui scientifique, on n'arrivera pas à terminer notre travail , elle a toujours été là pour nous conseiller au cours de l'élaboration de ce mémoire. Que ce travail soit un témoignage de notre gratitude et notre profond respect.

Et elle nous a honorées en acceptant de présider le jury de ce mémoire,

A notre chère professeur Mme Zama, DJ Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mentouri de Constantine,

A Mr. Boulkandoul, R, maître assistant à l'Université Mentouri de Constantine,

A Mme Tour, H maître assistante à l'université Mentouri de Constantine à la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Un grand merci à vous d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, on espère être à l'hauteur de votre confiance.

Une autre fois A notre chère professeur Mme Zama, A notre cher professeur Mr LALAOUI K et la chère Mme Ammedah Souad, Professeurs à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mentouri de Constantine. Recevez, nos plus sincères remerciements de nous avoir fait profiter de vos nombreuses connaissances dans cette spécialité.

A toute personne qui nous a donné la main pour nous aider à finir notre mémoire. Sans oublier nos collègues de toxicologie et santé, on veut vous dire qu'on n'oubliera jamais les trois ans qu'on a passé ensemble.

Dédicaces

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible. !

Quand il y a la soif d'apprendre, tout vient à point à qui sait attendre.

Je dédie ce travail à :

A mon cher papa Bounab Lazher, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai toujours eu pour vous. Je vous remercie pour les efforts que vous avez fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices pour mon éducation , je vous promet papa que je ferai de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir .Que dieu le tout puissant vous préserve , vous accorde santé , bonheur, et vous protège de tout mal . Je t'aime énormément.

A maman chérie Benazouz Noura, votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon mari Fathi Merabet, tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Que dieu réunisse nos chemins pour l'éternité Incha' Allah. Merci infiniment !

A ma sœur Iman, Son mari Ibrahim et ses enfants Iyad et tesnim Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Je n'oublierai jamais votre affection et votre aide. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A mes chères sœurs Lyna, Meryem, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite. Que dieu vous protège pour moi.

Bounab Romaiissa

Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude

A ma très chère maman RABIA

la plus belle chose dans ma vie. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être .Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie

A mon Père SALEH

Merci d'avoir sacrifié pour ma réussite, Grâce à vous mon chemin est éclairé en me donnant des conseils, du courage, d'espoir. J'espère qu'un jour, je pourrai vous rendre un peu de ce que vous avez fait pour moi, que dieu vous prête bonheur et longue vie.

A mon mari OUSSAMA

mon conseiller, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles.

A mes frères HICHEM et ABD ELJALIL

Merci à vous pour tout l'aide que vous m'avez donné, Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège pour moi.

A ma très chère sœur KHAWLA et la petite RITEL

les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur, De santé et de réussite

Menzer Meriem

Dédicace

Je remercie en premier lieu 'ALLAH' le Miséricordieux de ma avoir donné la force, Volonté, et la patience durant toutes mes années d'étude.

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère FATIMA : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicaces ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissances, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon père ALLOUA : Je vous remercie pour vos conseils qui ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre patience et votre compréhension sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours tu m'apporter.

A mes adorables sœurs : IMENE, HAKIMA et ses enfants MERIEM et HAROUN.

A mes chers frères surtout MOHAMED et YOUSSEF

Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, tendresse, vous avez donné un gout et du sens à ma vie .en témoignage de ma grande affection, je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement .je prie dieu pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.

A tous les membres de ma famille, petite et grande et aussi mes chères amies et mes chers collègues

Merci beaucoup a tous mes professeurs qui m'ont enseigné

Amedjoudj Nour El Houda

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

La première partie: étude bibliographique

Chapitre I : le stress oxydant

1-définition.....	3
2- les radicaux libres.....	3
2-1- définition des radicaux libres.....	3
2-2- les différents types des radicaux libres.....	4
2-2-1- Les formes réactives de l'oxygène.....	4
2-2-2- Les formes réactives de l'azote.....	6
2-3- le rôle des radicaux libres.....	7
2-4- les sources des radicaux libres.....	7
2-4-1- de l'intérieur.....	7
2-4-2- de l'extérieur.....	9
3- les conséquences du stress oxydant.....	9
3-1- les conséquences biochimiques.....	9
3-1-1- la peroxydation lipidique.....	9
3-1-2- acide désoxyribonucléique.....	10
3-1-3- les protéines.....	11
3-2- les conséquences biologiques.....	12
4- les maladies du stress oxydant.....	12
5- le système antioxydant.....	13
5-1- les antioxydants endogènes.....	14
5-1-1- les systèmes de défense enzymatique.....	14
5-1-2- les systèmes de défense non enzymatique.....	14
5-2- les antioxydants exogènes.....	16
5-2-1- la vitamine C.....	16
5-2-2- la vitamine E.....	16
5-2-3- les caroténoïdes.....	16
5-2-4- les polyphénols.....	17
5-2-4-1- classification des polyphénols.....	18
5-2-4-2- Rôle des polyphénols dans la santé humaine.....	21

Chapitre II : la toxicité de la Doxorubicine

1- La Doxorubicine.....	22
1-1- Structure et propriétés chimiques.....	22
1-2- La pharmacocinétique de la doxorubicine.....	23

1-2-1- Absorption et distribution.....	23
1-2-2- Métabolisme.....	23
1-2-3- Elimination.....	24
1-3- Mécanisme d'action.....	24
1-3-1- Mécanismes liés aux altérations de l'ADN.....	25
1-3-2- Mécanismes liés aux radicaux libres.....	25
2- La toxicité de la DOX.....	26
2-1- La cardiotoxicité.....	27
2-1-1- Stress oxydatif.....	28
2-1-2- Le dysfonctionnement mitochondrial.....	28
2-1-3- L'hémostase calcique.....	28
2-1-4- Liaison avec les phospholipides.....	29
2-1-5- La toxicité des métabolites.....	29
2-2- L'hépatotoxicité.....	29
2-3- La néphrotoxicité.....	30
3- la prévention de la toxicité du doxorubicine.....	30
3-1- Le rôle protecteur des composés phénoliques contre la toxicité induite par la doxorubicine.....	31

Chapitre III- La famille des Rosacées

1- Les principales sous-familles.....	35
1-1- Agarioïdées.....	35
1-2- Rosoïdées.....	35
1-3- Amygdaloïdées ou Prunoïdées.....	35
1-4- Maloïdées.....	35
1-5- Spiroïdées.....	35
2- Les plantes médicinales.....	35
2-1- L'aigremoine (<i>Agrimonia eupatoria</i>).....	35
2-2- L'aubépine.....	36
2-3- L'abricotier du Japon (<i>Prunus mume</i>).....	37
3- <i>Malus hupehensis</i>	38

La deuxième partie : étude expérimentale

I- Matériels et méthodes

1- L'extraction de la plante.....	39
1-1- Procédures de l'extraction de la plante.....	39
2- Modèle expérimentale in vitro.....	39
2-1- Dosage des polyphénols totaux.....	39
2-2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	40
2-3- Test de piégeage du radical libre DPPH.....	40
2-4- Inhibition de la peroxydation lipidique.....	41
3- Modèle expérimental in vivo.....	41
3-1- Animaux et conditions d'hébergement.....	41

3-2- toxicité aigüe par la Doxorubicine.....	41
3-3-Dosages des paramètres biochimiques.....	42
4-Évaluation statistique.....	42

II-Résultats et discussion

1- Résultats	
1-1-Rendements d'extraction.....	43
1-2- Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux	43
1-3-Piégeage du radical libre DPPH.....	43
1-4-Evaluation <i>in vitro</i> de la peroxydation lipidique.....	44
1-5-Influence du traitement sur la fonction rénale.....	45
1-6-Influence du traitement sur la fonction hépatique et cardiaque.....	46
1-7-Influence du traitement sur le profile lipidique.....	47
2-Discussion.....	49
Références bibliographiques.....	54
Résumé.....	63

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ERO/ROS : Espèces Réactive de l'oxygène
FRO : Formes Réactives de l'oxygène
FRN : Formes Réactives de l'azote
O₂^{•-} : Anion super oxyde
•OH : Radicale Hydroxyle
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
NO• : Le monoxyde d'azote
ONOO- : Peroxynitrite
RO• : Radicale Alkoxyles
ROO• : Radicale peroxyles
ROOH : Radicale hydro peroxydes
SOD : Superoxyde Dismutase
GSH : Glutathion
GSH Px : Glutathion Peroxydase
CAT : Catalase
CoQ10 : Ubiquinone ou Coenzyme Q10
LDL : Lipoprotéines de basse densité
HDL : Lipoprotéines de haute densité
VIT E : La vitamine E
DOX : Doxorubicine
DOX ol : Doxorubicinol
AGPI : Acides Gras Polyinsaturés
Fe²⁺ : Ions ferreux
Fe³⁺ : Ions ferriques
ATP : Adénosine triphosphates
ADP : Adénosine di phosphates
AMP : Adénosine mono phosphate
MPT : Mitochondrial Permeability Transition Pore
MMP : Potentiel Membranaire Mitochondrial
NFκB : Nuclear Factor kappa B
IKB : Inhibiteur de kappa B
MDA : Malondialdéhyde
TBA : Thiobarbiturique
ALAT : Alanine Amino Transférase
ASAT : Aspartate Amino Transférase
LDH : Lactate déshydrogénase
DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
Bax : Bcl (B cell lymphoma)

DO : la densité optique

GAE : équivalents d'acide gallique

QE : Equivalents de Quercétine

A : Absorption

R : Rendement

L'IC50 : Concentration inhibitrice à 50 %

Liste des figures

Figure 1 : Stress oxydant

Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et azotés

Figure 3 : Anion super oxyde et ses dérivés

Figure 4 : Origine des espèces réactives de l'oxygène

Figure 5 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène

Figure 6 : Production d'oxydants par le phagocyte activé

Figure 7 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras Polyinsaturés et nature des produits terminaux formés

Figure 8 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules

Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire

Figure 10 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants

Figure 11 : structure chimique des formes réduites, radicalaire et oxydée du CoQ

Figure 12 : la classification des composés phénoliques

Figure 13 : structure chimique de tanin

Figure 14 : Représentation des tannins hydrolysables et condensés

Figure 15 : la structure commune des flavonoïdes (A) et leurs Classification (B)

Figure 16 : les structures chimiques des flavonoïdes majeurs

Figure 17 : Effets bénéfiques des polyphénols sur la santé

Figure 18 : La structure de la doxorubicine

Figure 19 : La biotransformation de la doxorubicine

Figure 20 : La doxorubicine et cycle redox

Figure 21 : Effets secondaires de la doxorubicine

Figure 22 : Les voies suggérées pour expliquer la cardiotoxicité de la doxorubicine

Figure 23 : Le rôle protecteur de la dexrazoxane contre les dommages cellulaires induits par la doxorubicine.

Figure 24 : Le rôle protecteur des composés phénoliques contre la toxicité induite par la doxorubicine

Figure 25 : Agrimonia eupatoria

Figure 26 : Aubépine (Crataegus sp)

Figure 27 : Prunus mume

Figure 28 : Pourcentage de l'activité antiradicalaire l'extrait n-butanol vis-à-vis du radical libre

Figure 29 : Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait n-butanol et la vitamine C

Figure 30 : Effet de la DOX, la vitamine E et de l'extrait végétal sur les taux sériques de l'urée et de la créatinine

Figure 31 : Effet de la DOX, la vitamine E et de l'extrait végétal sur les taux sériques de l'LDH, TGP (ALAT) et de la TGO (ASAT)

Figure 32 : Effet de la DOX, la vitamine E et de l'extrait végétal sur les taux sériques de cholestérol, LDL, HDL et des triglycérides

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rendement des extraits

INTRODUCTION

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'action d'un des médicaments anticancéreux les plus importants en chimiothérapie et en oncologie clinique connu sous le nom « doxorubicine » a été étudié d'une manière intense, ce médicament est utilisé pour le traitement d'une variété de tumeurs malignes [1], y compris le cancer du sein, la leucémie lymphoblastique, le carcinome ovarien et les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens. Les patients subissant une chimiothérapie à la doxorubicine (DOX) développent généralement des symptômes tels que les vomissements, la diarrhée, le rythme cardiaque irrégulier, les plaies buccales, les saignements anormaux et le gonflement des pieds. En outre, le traitement à la doxorubicine est caractérisé par des effets secondaires délétères au niveau des tissus sains, y compris la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité et une cardiotoxicité sévère, ce qui limite son utilisation [2]. Jusqu'à ce jour, aucun médicament chimique synthétisé n'est disponible pour prévenir l'action néfaste de la doxorubicine sans réduire son effet thérapeutique.

Classiquement, il est admis que le mécanisme principal de la 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, la topoisomérase II α . Or, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules quiescentes sur le plan prolifératif, comme le sont les cellules cardiaques. Ce constat a encouragé la recherche d'autres mécanismes susceptibles de rendre compte de la toxicité cardiaque. Plusieurs hypothèses sont alors avancées, dont la génération d'un stress oxydatif [3] et l'apoptose [4].

Dans le cadre de la thérapie et la protection contre les effets secondaires de la doxorubicine. Récemment des produits extraits des plantes ont attiré l'attention par leurs activités anticancéreuses, chimiopréventives et cardioprotectrices. Les essais précliniques ont montré des propriétés antioxydantes pour plusieurs substances phytochimiques tels que ceux des plantes *d'Aerva lanata*, *Aronia melanocarpa*, *Astragalus polysaccharide* et *Bombyx mori*. D'autres extraits végétaux ont montré une capacité à inhiber l'apoptose, tels que ceux des plantes *d'Astragalus polysaccharide*, *Azadirachta indica*, *Bombyx mori* et *Allium stivium*. Contrairement aux agents synthétiques, les substances phytochimiques ne nuisent pas l'activité clinique de la DOX [5].

A la lumière de ces données, notre travail a pour objectif de mettre en évidence l'effet protecteur des polyphénols de l'extrait *n*-butanol d'une plante médicinale de la famille des Rosacées vis à vis les effets cytotoxiques induits par la DOX chez les rats.

Notre travail sera réparti en deux sections, dont la première est une étude bibliographique. Dans son premier chapitre nous présenterons la notion du stress oxydant, les systèmes de défense antioxydant et les cibles du stress oxydant. Nous aborderons dans le deuxième chapitre la DOX, son cinétique dans l'organisme et ces effets toxiques ainsi que l'effet protecteur des polyphénols. Dans le troisième chapitre nous présenterons les plantes médicinales de la famille des Rosacées.

La deuxième section est la partie expérimentale, elle comporte deux parties, dans la première (matériel et méthodes) nous décrirons les méthodes utilisées dans ce travail. La deuxième partie exposera les résultats obtenus et la discussion.

**LA PREMIERE
PARTIE
ETUDE
BIBLIOGRAPHIE**

1- Définition :

De manière générale, le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (ERO) et les défenses antioxydantes de l'organisme en faveur des premières [6,7]. Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense [8] (figure 1). Un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses [9].

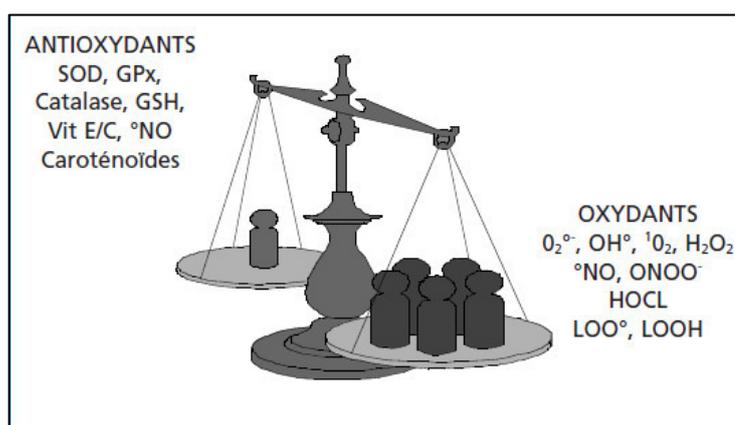


Figure 1 : Stress oxydant [8]

2- Les radicaux libres :

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires [6].

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées [7].

2-1- Définition des radicaux libres :

En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre sur leur couche périphérique ce qui le rend extrêmement réactif [10]. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule [11].

2-2- les différents types des radicaux libres :

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer les radicaux primaires qui jouent un rôle particulier en physiologie, Les autres radicaux libres dits radicaux secondaires se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [6] comme les radicaux peroxydes (ROO^\bullet), les hydro peroxydes (ROOH) et les radicaux alkoxydes (RO^\bullet) (Figure 4) [12].

Trois principales familles d'oxydants sont actuellement connues et à l'origine de nombreux effets biologiques. Il s'agit des formes réactives de l'oxygène (FRO), des oxydants chlorés et enfin des formes réactives de l'azote (FRN) [8] (figure 2).

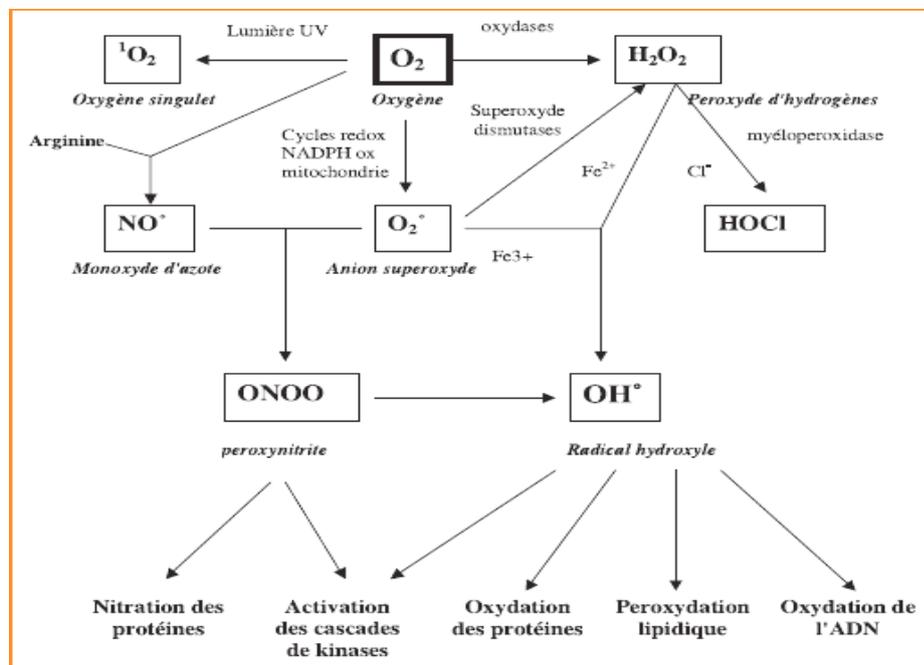


Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et azotés [6]

2-2-1- Les formes réactives de l'oxygène :

- **L'anion superoxyde :**

Le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) est l'ERO qui possède la plus faible réactivité vis-à-vis des substrats bio-organiques en raison d'une constante vitesse faible. Ainsi, environ 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial sont transformés en radicaux superoxydes lors de la première réduction électronique de l'oxygène [12] (figure 4). Il est également un précurseur de d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical hydroxyle (OH^\bullet) et le peroxynitrite

(ONOO^-) [11] (figure 3). Les radicaux superoxydes sont impliqués dans les phénomènes d'apoptose, dans la prolifération des cellules musculaires lisses, dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire [13].

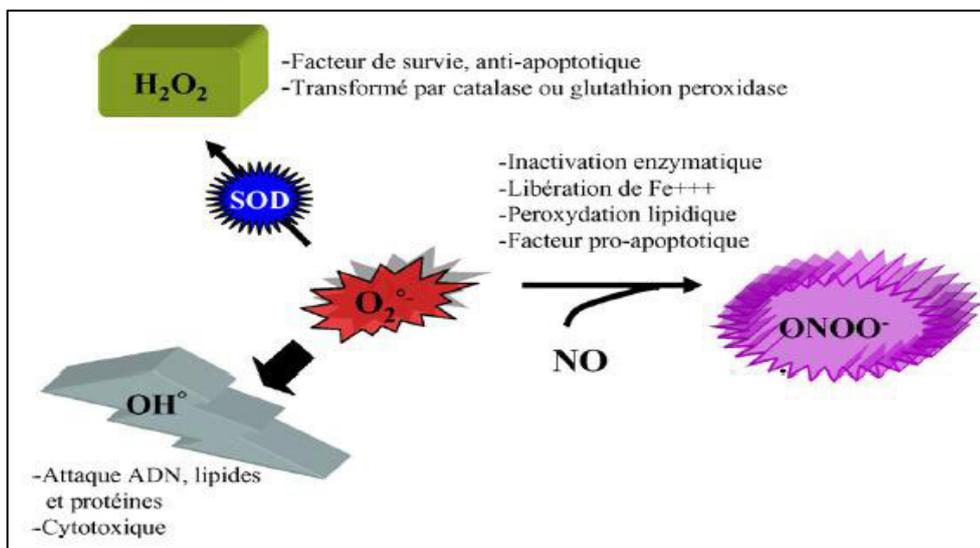


Figure 3 : Anion superoxyde et ses dérivés [11]

- **Le radical hydroxyle :**

Les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) sont les ERO les plus dommageables du stress oxydant en raison de leur extrême réactivité [13]. Ils sont formés par l'interaction de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ avec les ions métalliques libres (fer ou cuivre) (figure 4). Ils sont capable de fragmenter l'ADN [11], les structures lipidiques surtout les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et les lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles [13].

- **Le peroxyde d'hydrogène :**

La production des radicaux superoxydes est régulée par les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent leur dismutation en H_2O_2 (figure 3 et 4). Le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et capable de donner naissance via des réactions de type « réaction de Fenton », à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle [12].

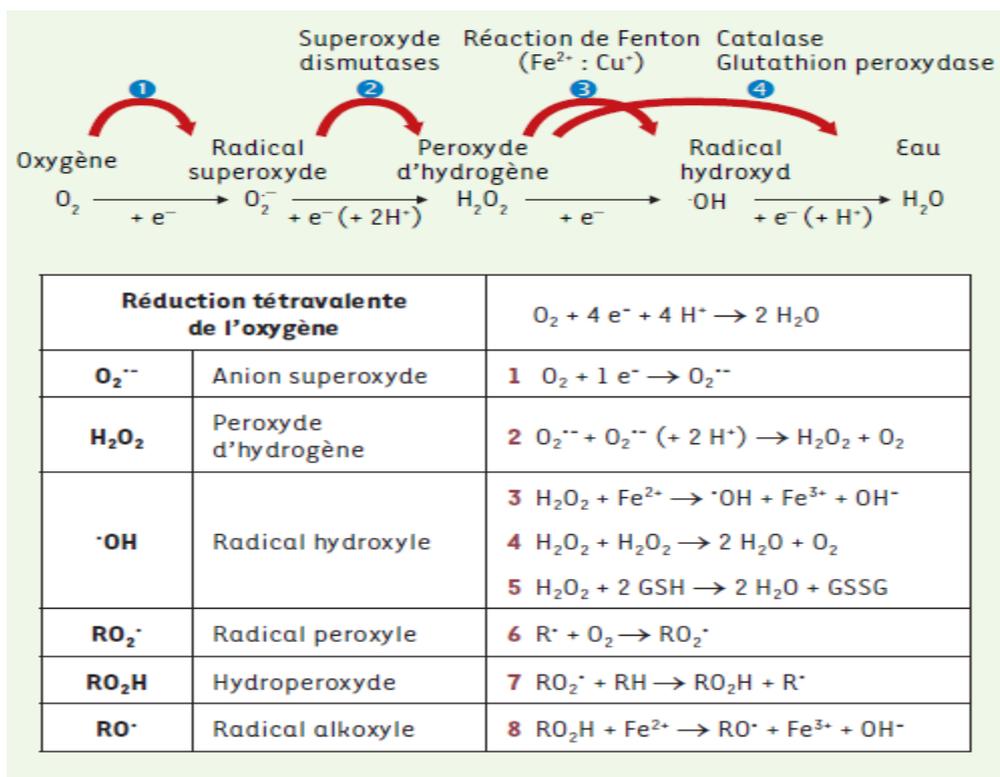


Figure 4 : Origine des espèces réactives de l'oxygène [12]

2-2-2- Les formes réactives de l'azote :

Ces radicaux primaires dérivent de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$) [6].

- **Le monoxyde d'azote :**

Le monoxyde d'azote radicalaire est un composé important, il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action des NO synthétases sur la L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme, telles que le maintien du tonus vasculaire, de la neurotransmission et du fonctionnement rénal [7].

- **Le peroxydinitrite :**

Le peroxydinitrite est un oxydant puissant et diffusible capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. Le monoxyde d'azote radicalaire peut former avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$) (figure 3) [7], bien connu pour ses effets délétères sur l'ADN, les protéines et les lipides [12].

2-3- Le rôle des radicaux libres :

Le rôle des ERO est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité [7] et jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose, l'expression de certains facteurs de transcription ou comme modulateurs de l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes anti- oxydantes [10]. Citons aussi le processus de fécondation au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule [7].

2-4- Les sources des radicaux libres :

Ils ont plusieurs origines, aussi bien à l'intérieur de l'organisme qu'à l'extérieur (figure 5).

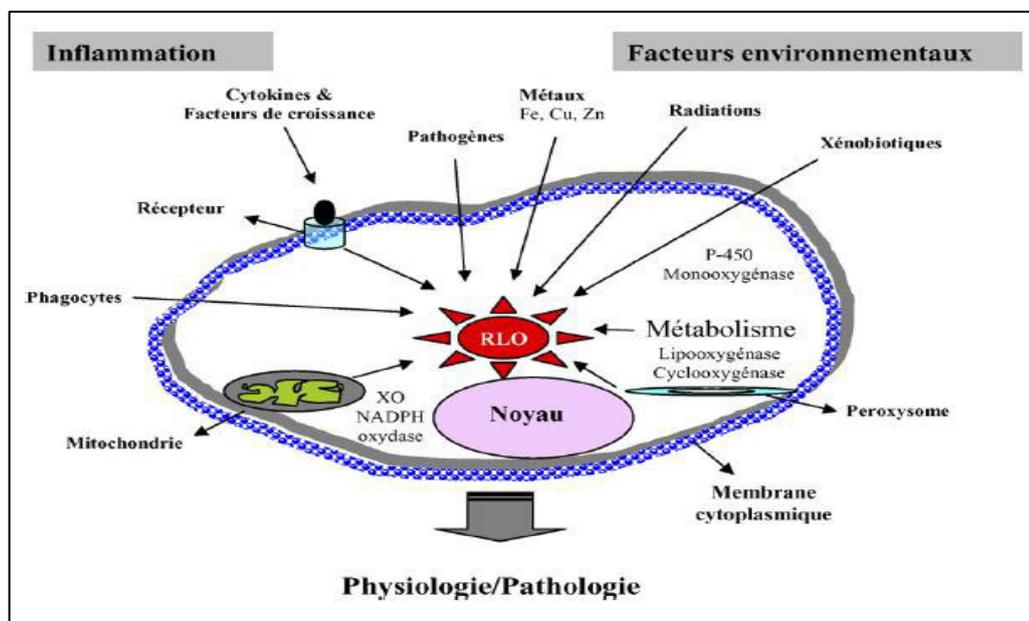


Figure 5 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène [11].

2-4-1- De l'intérieur :

Les sources métaboliques produisant les radicaux libres sont nombreuses :

- **La chaîne respiratoire mitochondriale :**

La mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante [10]. En effet, lors du métabolisme normal, la réduction tétravalente de l'oxygène en eau (Figure 4) se fait en plusieurs étapes successives qui donnent naissance à des intermédiaires potentiellement réduits,

appelés radicaux primaires ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) [12] comme l'anion super oxyde ou le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$). D'autres entités non radicalaires de l'oxygène peuvent être produites, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [10].

- **Les oxydases :**

L'activation des phagocytes représente une autre source de production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par un complexe enzymatique, le système de la NADPH oxydase. Cette enzyme, activée normalement par la phagocytose (Figure 6) [8].

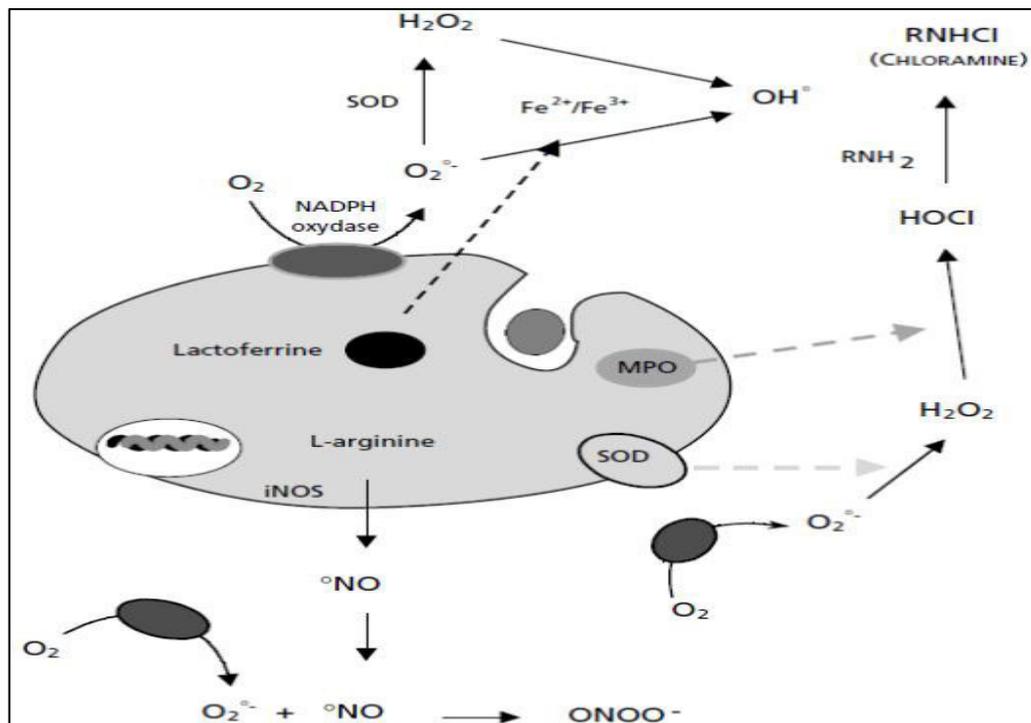


Figure 6: Production d'oxydants par le phagocyte activé [8].

D'autres sources peuvent produire des ERO, par exemple, la xanthine oxydase qui catalyse l'oxydation de l'hypo xanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines entraîne la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ [12].

- **Les mécanismes de cycles redox :**

Les mécanismes de cycle redox produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P₄₅₀. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments mais il se produit aussi avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines [6].

2-4-2- De l'extérieur :

La pollution, le tabagisme, une consommation excessive d'alcool, la prise de pilule contraceptive, l'exposition immodérée au soleil ou à des radiations sans protection suffisante, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique. Une alimentation pauvre en fruits et légumes sont des sources de production d'ERO [9].

Les métaux toxiques et aussi le cuivre et le fer libres génèrent des radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 par une réaction appelée réaction de Fenton (figure 4) [6].

3- Les conséquences du stress oxydant :

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des 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 [6].

3-1- les conséquences biochimiques :

3-1-1- La peroxydation lipidique :

Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines [14]. Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons [6], c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO^{\bullet}), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin [7], Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne (figure 7) car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué [6]. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire [7].

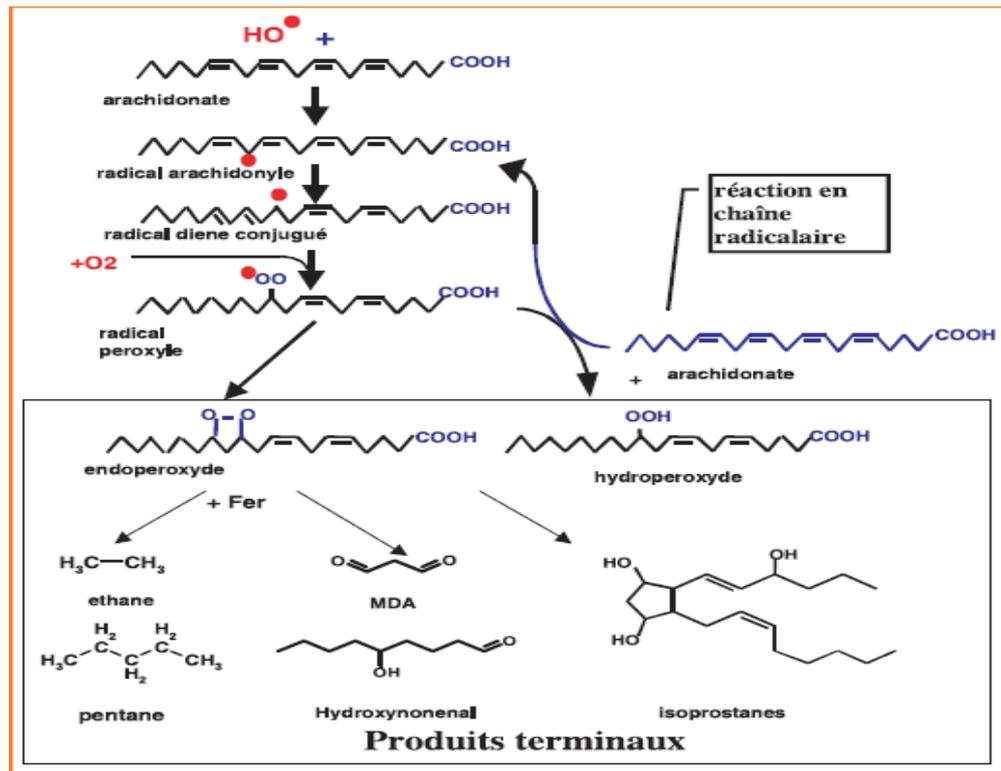


Figure 7 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés [6]

3-1-2- L'acide désoxyribonucléique ou ADN :

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\cdot\text{OH}$ peuvent être générées parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN et particulièrement la guanine sont sensibles à l'oxydation (figure 8) [6].

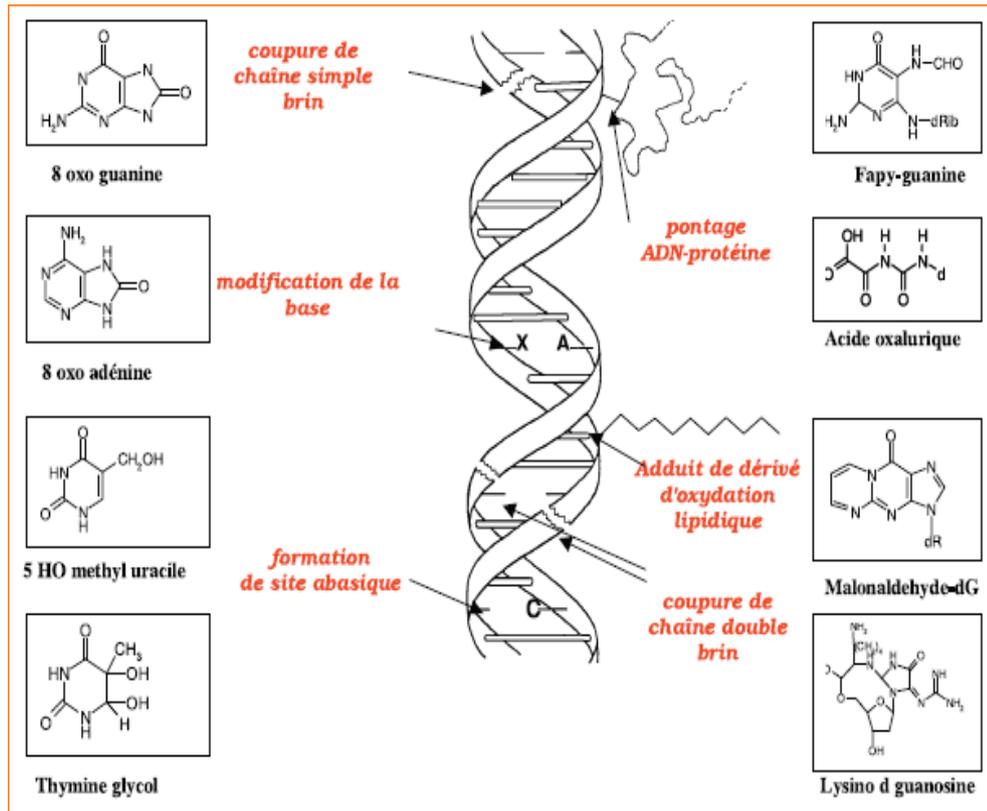


Figure 8 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules [6]

3-1-3- Les protéines :

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées [6] (figure 9). La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [7].

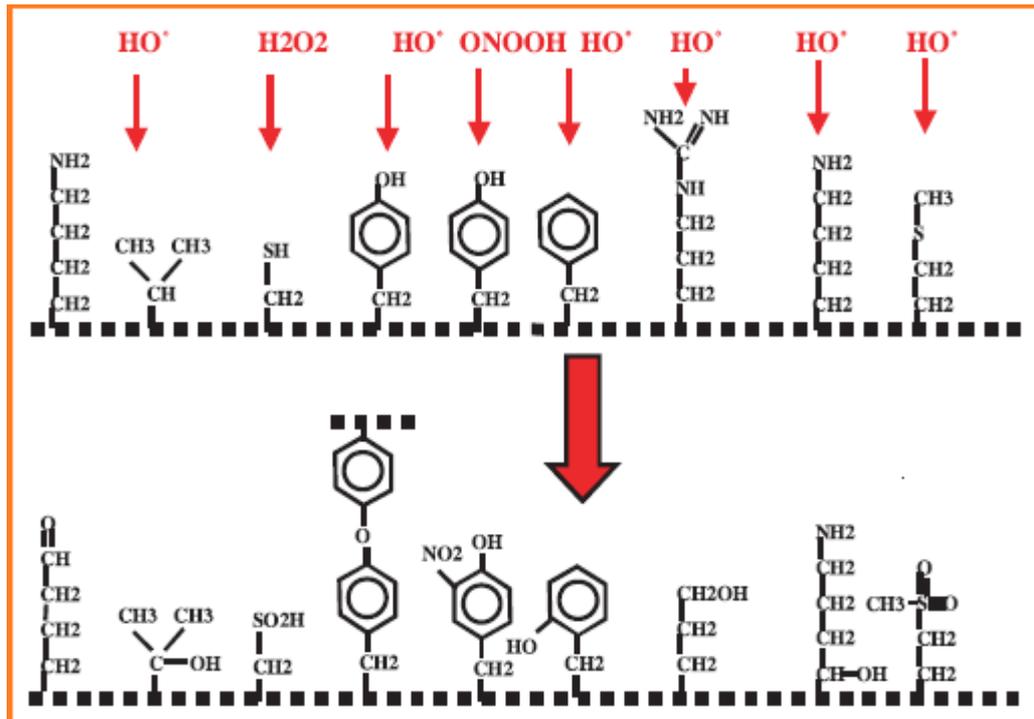


Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire [6]

3-2- Les conséquences biologiques :

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De léger stress augmente la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, le stress moyen facilite l'apoptose alors que de fort stress désorganise la membrane cellulaire entraînant des lyses immédiates (nécrose) [6].

4- Les maladies liées au stress oxydant :

En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses anti oxydantes et augmente la multiplication mitochondriale des radicaux [15]. Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré [6]. C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [15].

5- Le système antioxydant :

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression d'ERO grâce à divers mécanismes de défense en tant que enzymatiques que non enzymatiques [8]. On distingue deux sources d'antioxydants, l'une est exogène apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes, l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes anti oxydantes (figure 10) [7].

Les antioxydants peuvent être définis comme un ensemble de molécules ou d'éléments susceptibles de prévenir le stress oxydatif cellulaire ou de lutter contre l'extension de ses organiques. Au sens large, ce terme évoque des substances conséquences capables d'inhiber directement la production radicalaire, d'en limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène une fois formées. Le mode d'action des antioxydants peut être de réduire ou de dismuter les radicaux libres, de les piéger pour former un composé stable [16].

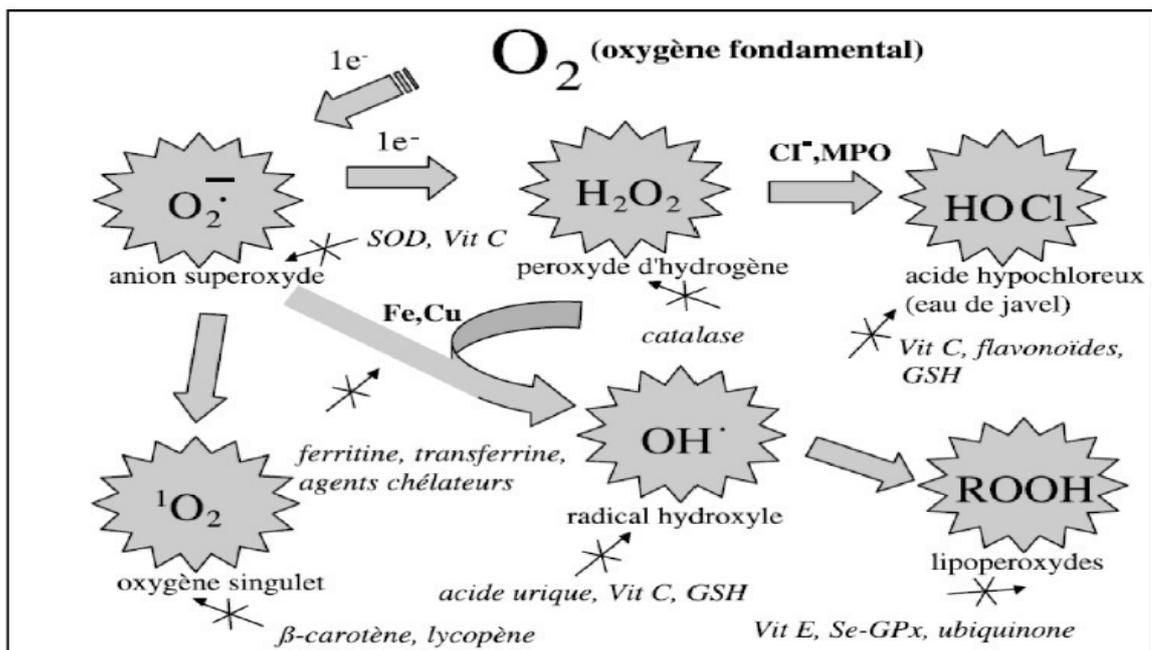


Figure 10 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants [8]

5-1- Les antioxydants endogènes :

5-1-1- Les Systèmes de défense enzymatiques :

- **Les superoxydes dismutases (SOD) :**

L'ion superoxyde est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres, le super oxyde dismutase inactive l'ion super oxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène par une réaction de dismutation [17].

Chez l'homme, on décrit 3 isoformes de l'enzyme SOD, la Cu/Zn-SOD ou SOD1 cytosolique, et la SOD2 qui utilise le manganèse, elle joue un rôle important dans la protection des radicaux libres induits par l'hyperoxie. La ECSOD ou SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique [11].

- **La catalase :**

La catalase est une enzyme intracellulaire qui assure la réduction de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Cette enzyme est localisée uniquement dans les peroxysomes et ne peut donc pas agir dans les autres compartiments cellulaires (cytoplasme, mitochondrie, lysosome, noyau) où le peroxyde d'hydrogène est également présent [14].

- **Glutathions peroxydases (GSHPx) :**

Le glutathion peroxydase est une sélénoprotéine intracellulaire qui catalyse la destruction des peroxydes d'hydrogène. La GSHPx agit également sur les hydroperoxydes qui proviennent de la peroxydation des acides gras (Acide linoléique, linoléique, arachidonique) [11]. Elle élimine également les peroxydites qui sont des oxydants très puissants [7].

5-1 -2- Les systèmes de défense non enzymatique :

- **Le glutathion (GSH) :**

Le glutathion(GSH) est un tripeptide intracellulaire. La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant c'est-à-dire de réducteur qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées et en particulier de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles [13].

Le glutathion joue un rôle essentiel dans la préservation des formes actives de divers antioxydants de faible taille (vitamines C, E, ubiquinone, polyphénols). A ce titre, le GSH constitue l'antioxydant principal de l'organisme d'autant qu'il est aussi le co-facteur de toute

une série d'enzymes antioxydantes (glutathion peroxydases, glutathion réductase, thiorédoxines et peroxyrédoxines) [9].

- **L'acide urique :**

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux ($\text{OH}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites notamment par la vitamine C [7].

- **L'ubiquinone ou Coenzyme Q10 (CoQ10) :**

Le CoQ10 est une molécule importante dans la production d'énergie par la mitochondrie et possède en plus des propriétés antioxydantes particulièrement complexes. Le CoQ10 agit en synergie très étroite avec la vitamine E dans la protection des membranes cellulaires. Le terme CoQ10 regroupe trois états d'oxydation de la molécule: une forme réduite (CoQH₂ ou UQH₂) appelée ubiquinol-10, une forme oxydée (CoQ10 ou UQ) appelée ubiquinone-10, et une forme intermédiaire le radical ubisemiquinone (figure 11). Parmi ces formes, c'est la seule forme réduite CoQ10H₂ qui est dotée de propriétés antioxydantes [18].

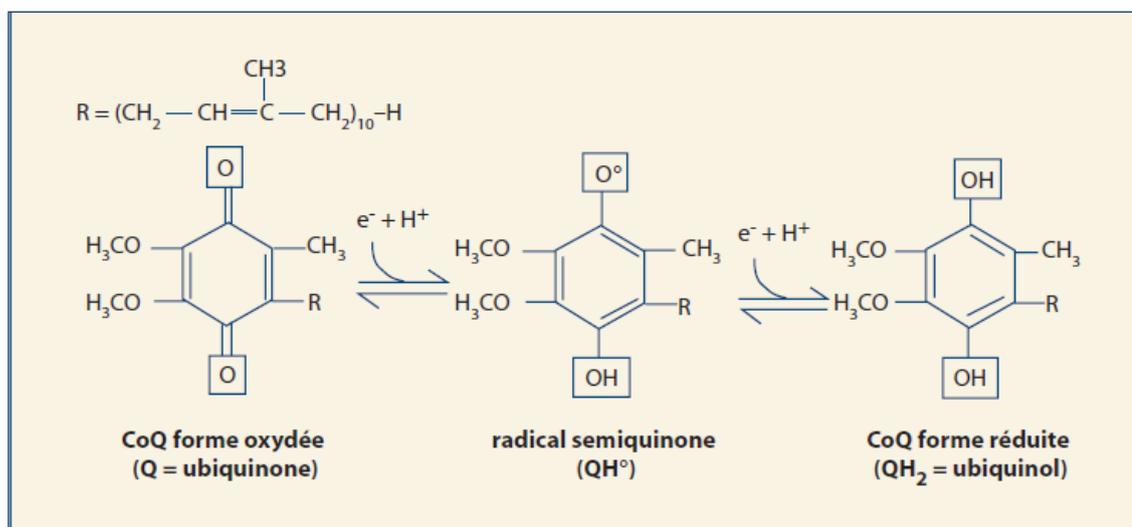


Figure 11 : structure chimique des formes réduites, radicalaire et oxydée du CoQ10 [18]

- **La bilirubine :**

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales, un composé non hydrosoluble qui se lie à l'albumine ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger ROO• et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires [19].

5-2- Antioxydants exogènes :

5-2- 1- La vitamine C :

Cette vitamine hydrosoluble est connue par son effet antioxydant qui se fait par l'inhibition des radicaux libres. En effet, l'action antioxydante de l'ascorbate ne doit pas être considérée de manière isolée mais comme un des maillons d'une chaîne dans laquelle interviennent d'autres acteurs tels que la vitamine E, superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion [20].

5-2- 2- La vitamine E :

Vitamine E est un terme qui désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols (α , β , γ , δ), Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique, c'est l' α -tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. La vitamine E s'insère au sein de la membrane biologique riche en acides gras polyinsaturés où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces oxygénées activées [21].

L'acide ascorbique à la surface interne de la membrane plasmique, peut régénérer le tocophérol à partir du radical tocophéroxyl produit par la réaction de la vitamine E avec un radical libre [20].

5-2- 3- Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes. Ils sont susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique mais d'une manière moins efficace que l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène

singulet, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire [13].

5-2- 4- Les polyphénols :

Les polyphénols est un groupe de molécules de structures variées, d'une grande utilisation en phytothérapie [22], et ils sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ces molécules sont présentes dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont généralement impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits [23].

On détermine le contenu des polyphénols dans les aliments végétaux par des facteurs génétiques et des conditions environnementales, la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement et le stockage. En concernant leur classification, Ils peuvent être divisés en classes variées en fonction de leur structure chimique de base [24] (figure 12). Ils existent dans les plantes, considérés comme des antioxydants et connus par leur capacité de piégeage des radicaux libres par un mécanisme d'inhibition des enzymes responsables de la production des ROS et interviennent dans la prévention de plusieurs maladies [25].

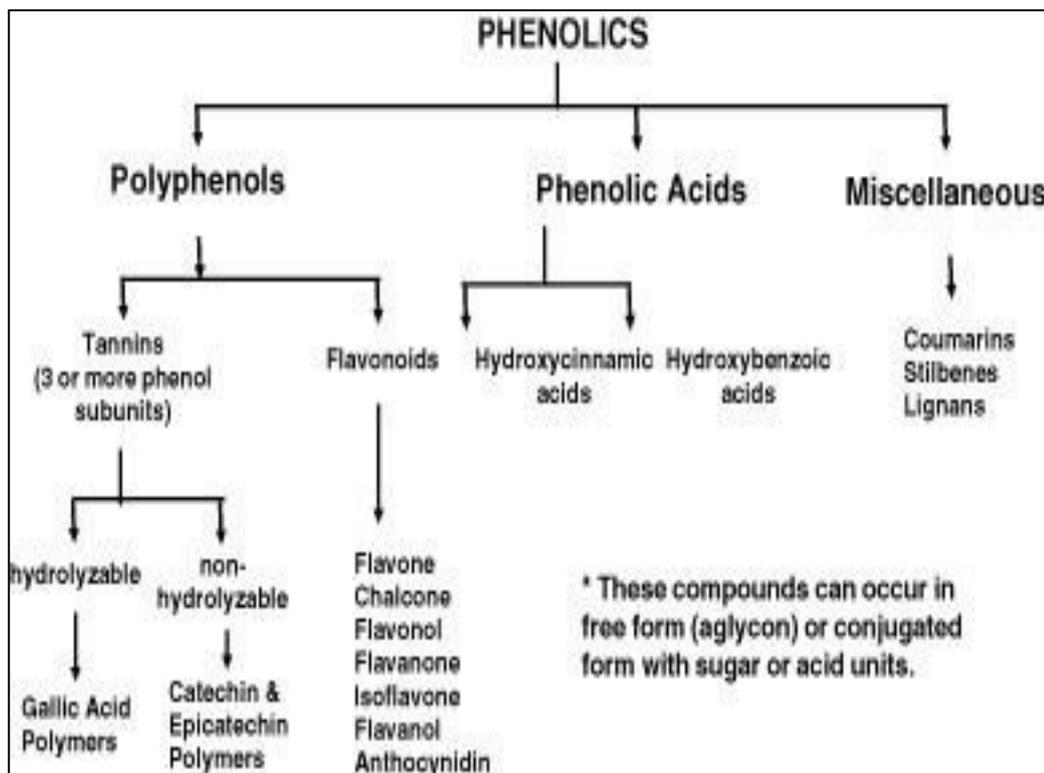


Figure 12 : la classification des composés phénoliques [26]

5-2- 4-1- Classification des polyphénols :

Les polyphénols sont classés en deux catégories, les tannins et les flavonoïdes (figure 12)

- **Tannins :**

Les Tannins ont le potentiel d'être la classe la plus importante des métabolites secondaires dans la défense des plantes contre l'herbivorité et cela s'agit de leur mode d'action, ils sont généralement considérés comme une substance défensive généralisée dont les effets néfastes ne sont que très peu dépendants de la structure moléculaire [27]. On distingue 2 catégories des tanins :

Tanin condensés :

Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes (C-C) ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydés par les acides forts libérant des anthocyanidines [28] (figure 14).

Tanins hydrolysables :

Leurs structures de base est constitué d'un glucide, habituellement le glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique, les résidus d'acides galliques se lient entre eux pour former un grand polymère réticulé (figure 14) [28].

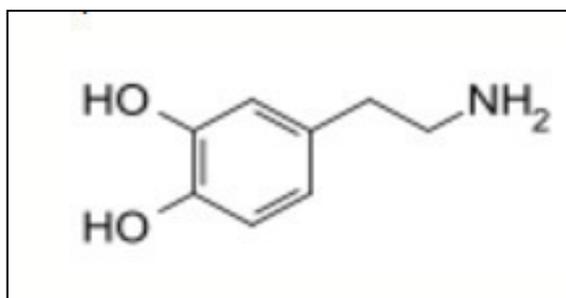


Figure 13 : structure chimique de tanin [29]

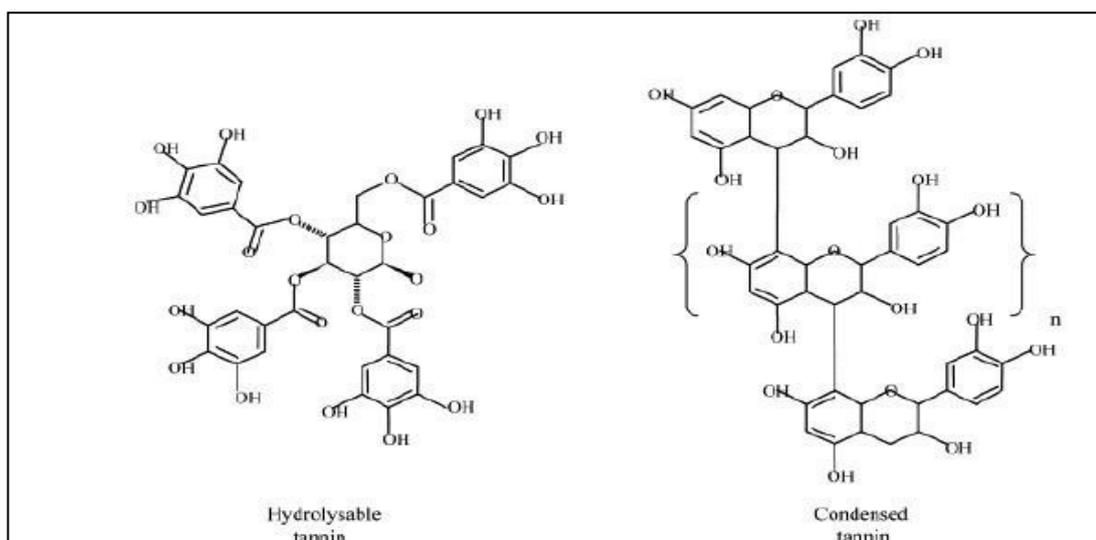


Figure 14 : Représentation des tannins hydrolysables et condensés [30]

- **Les Flavonoïdes :**

Les flavonoïdes sont le groupe le plus commun des polyphénols végétaux, Plus de 8000 flavonoïdes différents ont été décrits et ils sont prérogative du royaume des plantes. Les flavonoïdes sont structurés comme un squelette carboné commun de diphenyle propanes, deux anneaux de benzène (anneau A et B) reliés par une chaîne linéaire à trois carbones (C6-C3-C6) formant habituellement un noyau hétérocycle oxygéné, le noyau flavan (anneau C). Selon la complexité structurale des flavonoïdes et sur l'état d'oxydation de l'anneau central C, les

flavonoïdes sont sous-classés comme flavonols, flavones, flavanones, flavanols ou flavan-3-ol, isoflavone, anthocyanidines (Figure 15, 16) [31]. Ce groupe est donc un des groupes de constituants naturels les plus nombreux et les plus répandus, sont importants pour l'homme, et ils contribuent à la couleur des plantes [32].

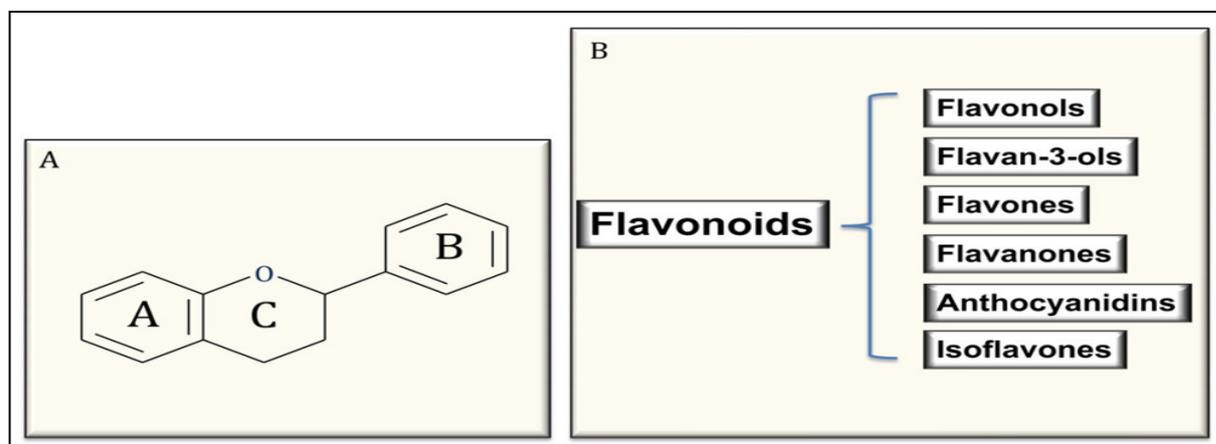


Figure 15 : la structure commune des flavonoïdes (A) et leurs Classification (B) [31]

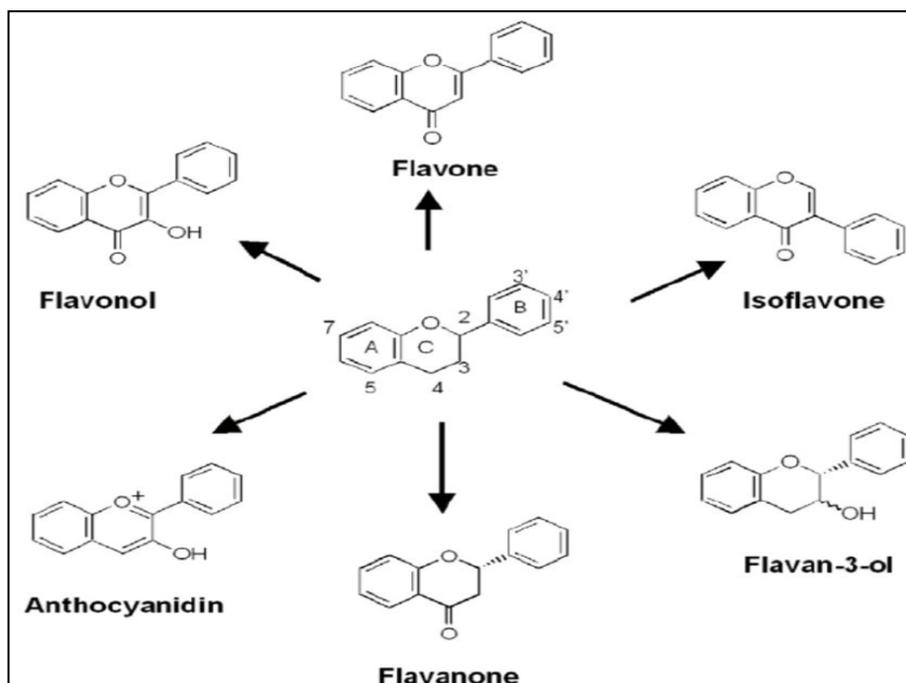


Figure 16 : les structures chimiques des flavonoïdes majeurs [33]

Les flavonoïdes sont capable de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une

multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés anti oxydantes, vasculo protectrices, anti hépatotoxiques , antiallergiques , anti-inflammatoires, antiulcéreuses [34].

Les flavonoïdes sont absorbés par les voies gastro-intestinales des humains et des animaux et sont excrétés soit sans changement, soit comme métabolites flavonoïdes dans l'urine et les excréments. Les flavonoïdes sont des antioxydants puissants, des piègeurs de radicaux libres et des chélateurs de métaux et inhibent la peroxydation des lipides. Les exigences structurales pour les fonctions antioxydantes et de radicaux libres de flavonoïdes comprennent un groupe hydroxyle en position carbone trois, Une double liaison entre les positions de carbone deux et trois, un groupe carbonyle en position carbone 4 et la polyhydroxylation des anneaux aromatiques A et B [35].

5-2-4-2- Rôle des poly phénols dans la santé humaine :

Les polyphénols et autres produits alimentaires phénoliques font l'objet d'un intérêt scientifique croissant en raison de leurs effets bénéfiques possibles sur la santé humaine en offrant une protection contre le développement des cancers, les maladies cardiovasculaires, diabète, de l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives (Figure 17) [36].

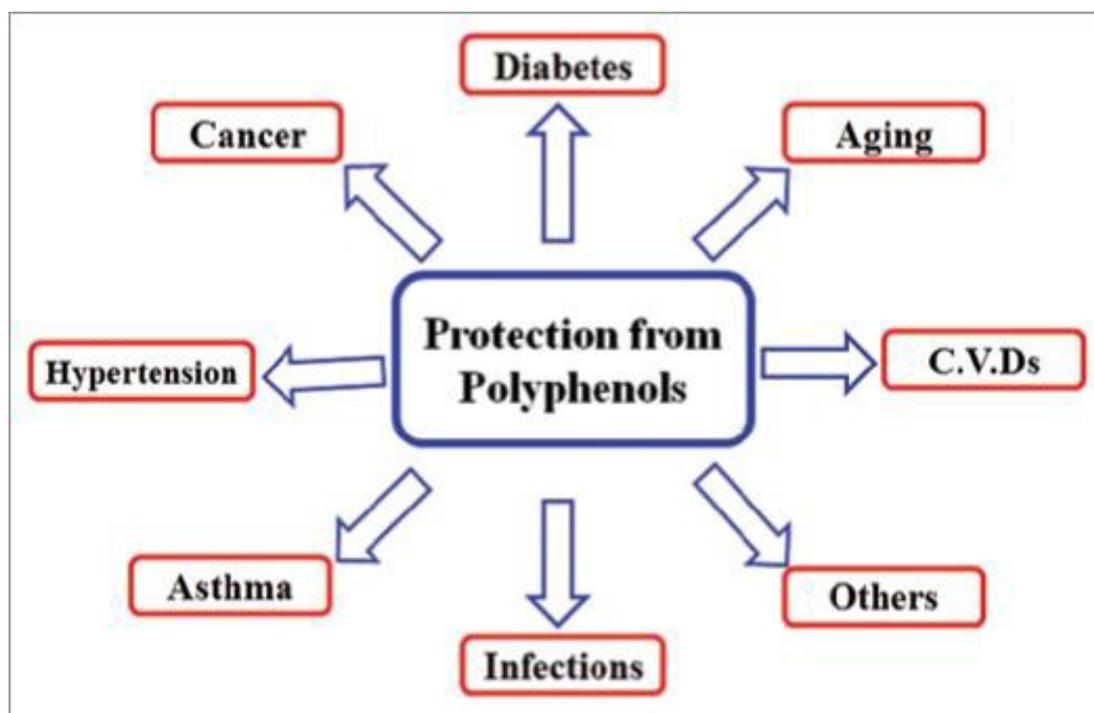


Figure : 17 : Effets bénéfiques des poly phénols sur la santé [37]

La chimiothérapie des cancers a évolué très rapidement au cours des dernières années [38], elle implique l'utilisation d'agents chimiques pour arrêter la croissance et éliminer les cellules cancéreuses, même dans des sites éloignés de l'origine de la tumeur primaire [39]. Les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine et daunorubicine) sont des agents anti tumoraux très largement utilisés en oncologie [40] pour les pathologies malignes aussi bien solides qu'hématologiques [41]. Toutefois, un certain nombre d'effets secondaires, notamment sur l'hématopoïèse et la fonction cardiaque, limitent leur utilisation [40].

Les anthracyclines telles que la doxorubicine ont été des piliers de la chimiothérapie du cancer, avec des succès remarquables dans le traitement des leucémies et des tumeurs malignes solides [42].

1- La doxorubicine :

La Doxorubicine (DOX) également appelée Adriamycine est l'un des médicaments anticancéreux les plus répandus dans le monde entier, la découverte de la doxorubicine était proche des années 1960 comme des antibiotiques anthracycline anticancéreux puissants [43]. Il est obtenu à partir de *Streptomyces peucetius*, bien qu'une synthèse chimique totale soit maintenant possible [44]. Il est également un agent chimio thérapeutique hautement efficace utilisés pour traiter une grande variété de cancers, sa valeur thérapeutique est limitée en raison de la cardiotoxicité cumulée [45]. Les tumeurs qui répondent mieux à l'adriamycine sont les carcinomes de l'œsophage et du sein, l'ostéosarcome, le sarcome de Kaposi, les sarcomes des tissus mous, les lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens [44].

1-1-Structure et propriétés chimiques :

La DOX est composé d'aglycone et de fragments de sucre. L'aglycone, appelée doxorubicinone, est composée d'un cycle tétra cyclique contenant de la quinone et d'une chaîne latérale courte avec un groupe carbonyle à C-13 et un alcool primaire à C-14; Le sucre appelé daunosamine est attaché par une liaison glycosidique à C-7 du cycle tétra cyclique et se compose d'un fragment 3-amino-2, 3,6-trideoxy-L-fucosyle (figure 18) [46].

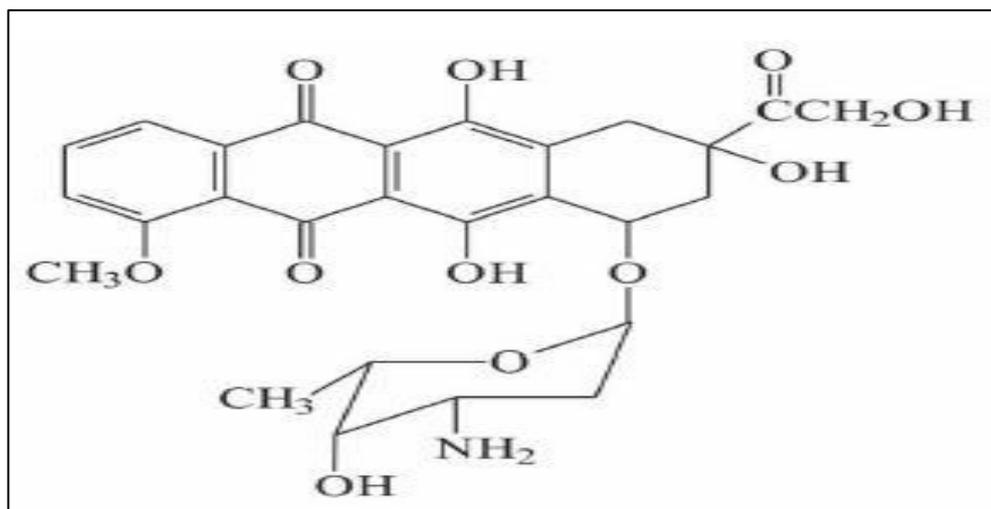


Figure 18 : La structure de la doxorubicine [47]

1-2-La pharmacocinétique de la doxorubicine :

1-2-1-Absorption et distribution :

La DOX est généralement administrée sous la forme d'une perfusion intraveineuse de 40 à 75 mg / m² répétée à des intervalles de 3 à 4 semaines, en prenant soin de ne pas dépasser une dose cumulative de 450-550 mg / m² [48].

La demi-vie de distribution initiale d'environ 5 minutes propose une absorption rapide des tissus de la DOX, tandis que son élimination est lente à partir des tissus qui se traduisent par une demi-vie terminale de 20 à 48 heures [43]. Comme la DOX est distribuée dans les tissus rapidement, cette vitesse de distribution est compensée par la chute rapide des niveaux de doxorubicine dans le sang. La DOX a la capacité de pénétrer efficacement dans les tissus tandis que la capacité de rester à l'intérieur des cellules nucléées est due à ses caractéristiques lipophiles et à leur propriété intercalaire liée par l'ADN. La DOX ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique [49]. La liaison de la DOX et de son principal métabolite, le doxorubicinol, aux protéines plasmatiques est d'environ 74 à 76% [43].

1-2-2-Métabolisme :

La DOX semble s'accumuler principalement dans le foie, probablement en raison du rôle de l'organe dans le métabolisme [49]. La principale voie du métabolisme de la doxorubicine chez l'homme est la conversion au doxorubicinol catalysé par la carbonyl réductase (CBR). Le

P450R contribue à la désintoxication de la doxorubicine en catalysant la déglycosylation réductrice vers un métabolite de 7-désoxyaglycone. En outre, la P450R catalyse la réduction de la doxorubicine à l'aide d'un électron à base de NADPH par le radical de semiquinone réactif et cytotoxique (SQ). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour amorcer le cycle de redox et la production des ROS (figure 19) [46, 50].

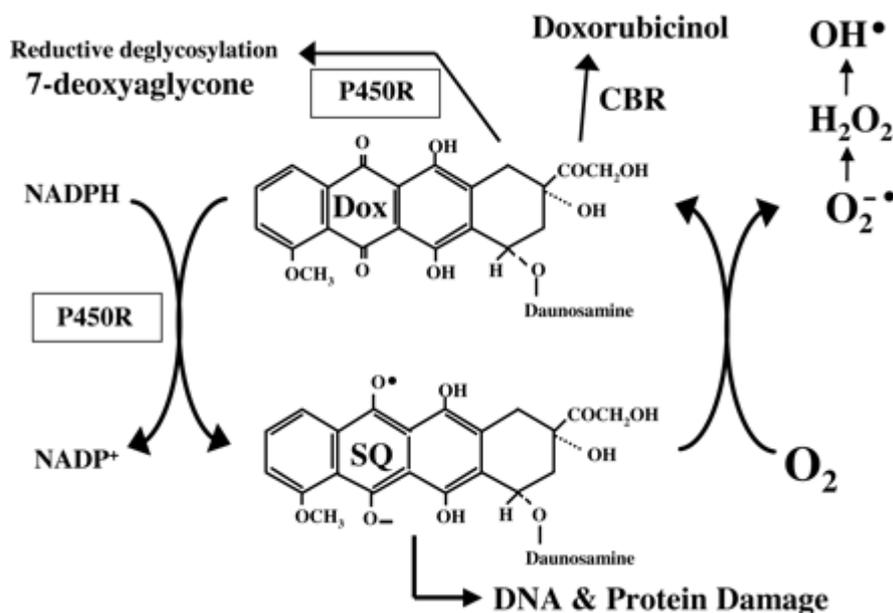


Figure 19 : La biotransformation de la doxorubicine [50]

1-2-3-Elimination :

L'excrétion de la DOX est principalement par voie biliaire. Près de 40% de la dose apparaît dans la bile en 5 jours alors que seulement 5 à 12% du médicament et ses métabolites apparaissent dans l'urine au cours de la même période.

Dans l'urine, <3% de la dose a été récupérée sous forme de doxorubicinol au cours des 7 jours [43].

1-3-Mécanisme d'action :

Malgré la large utilisation de la DOX dans le traitement des patients cancéreux, son mécanisme d'action n'est pas toujours connu et a souvent été controversée [44]. Il existe deux mécanismes proposés par lesquels la doxorubicine agit dans la cellule cancéreuse : L'intercalation dans l'ADN et la perturbation de la réparation de l'ADN médiée par la

topoisomérase II, la génération des radicaux libres et leur endommagement des membranes cellulaires, de l'ADN et des protéines [51].

1-3-1- Mécanismes liés aux altérations de l'ADN :

La capacité de DOX à inhiber la synthèse de l'ADN a été proposée comme mécanisme d'action de DOX [44], elle est rapidement absorbée dans le noyau des cellules où elle se lie avec une affinité élevée à l'ADN par intercalation classique entre les paires de bases [47], L'intercalation inhibe la réplication de l'ADN et aussi l'action des polymérases d'ADN et d'ARN [43].

La DOX est un inhibiteur puissant de la topo-isomérase II [42], une enzyme nucléaire essentielle qui régule la topologie de l'ADN lors de multiples processus d'ADN tels que la réplication, la transcription et la recombinaison [52]. L'inhibition du topo-isomérase II provoque une apoptose des cellules tumorales [43].

1-3-2- Mécanismes liés aux radicaux libres :

Deux voies différentes de formation de radicaux libres par la DOX ont été décrites [44]. La première voie implique la réduction d'un électron de la quinone qui est la forme initiale de la doxorubicine entraîne la formation d'un radical semi quinone [53] par l'action de plusieurs enzymes telle que la NADPH cytochrome P₄₅₀ réductase [44], Le radical semi quinone peut oxyder en présence d'oxygène en générant des anions super oxyde en revenant au composé initial (figure 19) [54]. Les radicaux libres peuvent conduire à la peroxydation lipidique et des lésions membranaires, des dommages à l'ADN, un stress oxydatif, et déclenchent des voies apoptotiques de la mort cellulaire [51].

Dans la deuxième voie, les radicaux libres de la DOX proviennent d'un mécanisme non enzymatique qui implique la formation d'un complexe organométallique entre la doxorubicine et le fer (Fe²⁺) [55]. Ce complexe peut réduire l'oxygène au peroxyde d'hydrogène et à d'autres espèces réactives d'oxygène qui peuvent conduire à la peroxydation lipidique [44] (figure 20).

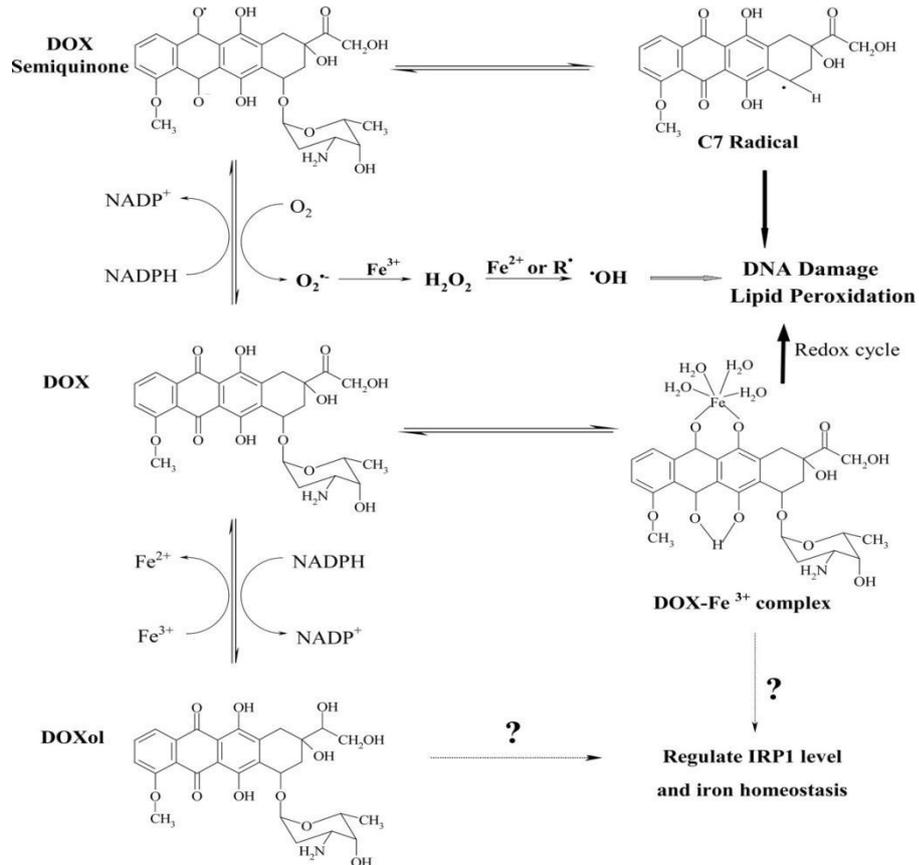


Figure 20 : La doxorubicine et cycle redox [53]

2-La toxicité de la DOX :

L'efficacité clinique de la DOX dans le traitement de différentes tumeurs malignes est affectée par divers effets limitant la dose tels que l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, la toxicité cutanée et la cardiotoxicité (figure 21) [52].

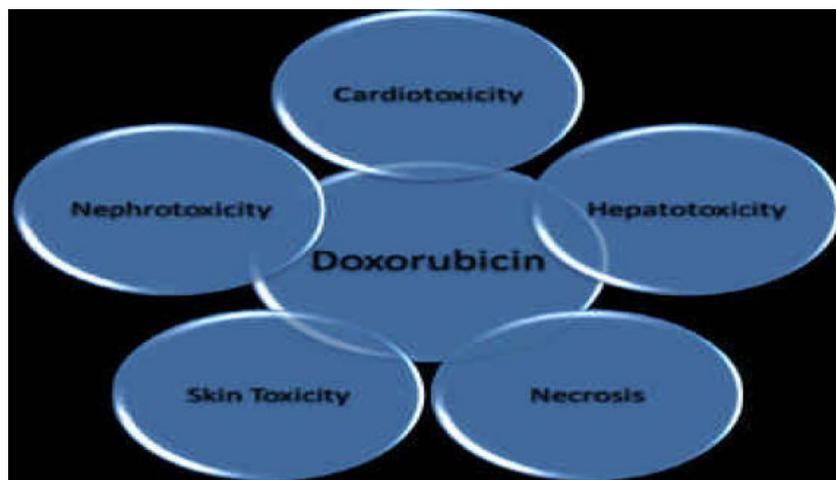


Figure 21 : Effets secondaires de la doxorubicine [52]

2-1-La cardiotoxicité :

La cardiotoxicité est l'un des désavantages majeurs de l'utilisation de la DOX. Plusieurs voies mécaniques ont été suggérées pour expliquer cette toxicité, Ceux-ci inclus : la perturbation de l'homéostasie du calcium, l'interférence avec les phospholipides membranaires, la toxicité des métabolites, le dysfonctionnement mitochondrial et la libération des radicaux libres réactifs [56] (figure 22). Ce sont les principales causes de cardiotoxicité induite par la doxorubicine, En outre, le niveau de stress oxydatif induit par la doxorubicine est jusqu'à 10 fois plus élevé dans le cœur que dans son niveau dans le foie, les reins ou la rate [43].

La DOX n'a pas seulement des effets toxiques chroniques, mais aussi aigus dans le cœur, Les effets chroniques à long terme, développés seulement après plusieurs semaines ou mois de traitement, comprennent l'apparition d'une cardiomyopathie qui entraîne souvent une insuffisance cardiaque congestive. Les effets aigus et à court terme sont caractérisés cliniquement par des dysrythmies auriculaires et ventriculaires, un syndrome de la péricardite et de la myocardite et des réactions hypertendues aiguës après l'administration du médicament [57].

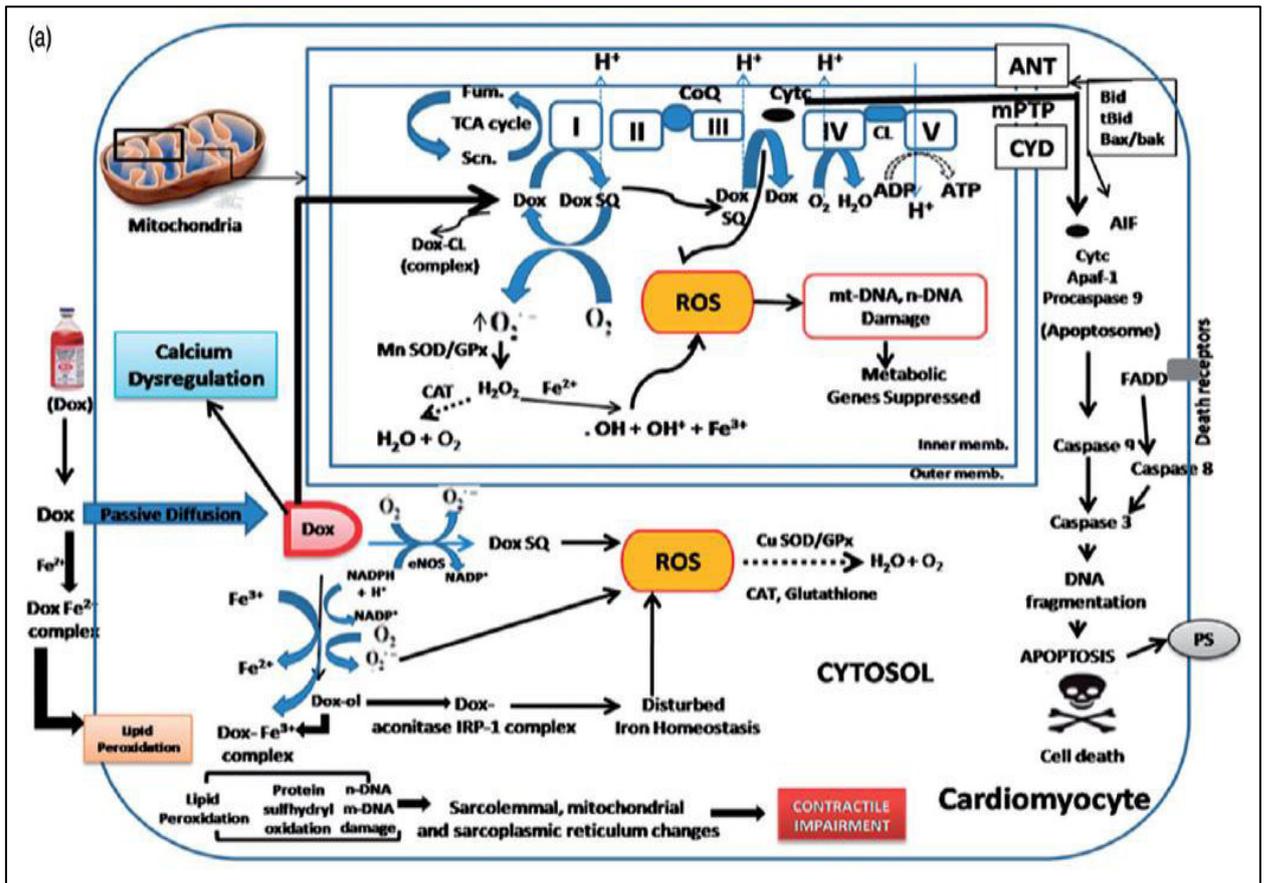


Figure 22 : Les voies suggérées pour expliquer la cardiotoxicité de la doxorubicine [45]

2-1-1-Stress oxydatif :

En ce qui concerne la cardiotoxicité par la DOX, il est intéressant de rappeler que le tissu cardiaque est très sensible aux dommages des radicaux libres, en raison de son métabolisme hautement oxydatif [44] et le déficit des défenses antioxydantes des myocytes cardiaques par rapport à d'autres organes tels que le rein et le foie [40].

La DOX est capable d'induire une production de radicaux libres oxygénés par deux voies. La première voie est enzymatique, implique la réduction de la DOX à la semi quinone, Ce dérivé peut à son tour subir une oxydation ou revenir à la forme quinone produisant ainsi des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). La deuxième voie est non enzymatique fait intervenir la formation d'un complexe organométallique entre la DOX et le fer, aboutit à la formation de radicaux $O_2^{\cdot-}$ [55].

Le stress oxydatif induit par la DOX peut affecter quelques enzymes fonctionnelles et des complexes de la chaîne de transport d'électrons et par conséquent déclenche la voie apoptotique indépendante de la mitochondrie intrinsèque. En outre, DOX provoque une dysrégulation du fer par la formation du complexe DOX-fer conduisant à l'inactivation du cytochrome c oxydase et des changements dans les processus homéostatiques de fer [45].

2-1-2-Le dysfonctionnement mitochondrial :

Les mitochondries, organites présents dans toutes les cellules du corps humain à l'exception les érythrocytes, jouent un rôle central dans la production d'énergies. Le dysfonctionnement mitochondrial a récemment été reconnu comme un élément central dans le développement de la cardiotoxicité induite par la DOX [58]. La DOX se réduit à un dérivé de la semiquinone dans le complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondrial et forme des radicaux libres qui augmentent les niveaux de stress oxydatif (figure 22) [42]. La DOX induit des anomalies dans les fonctions mitochondriales telles que les défauts de la chaîne respiratoire, la diminution de la production de triphosphate d'adénosine, l'endommagement de l'ADN mitochondrial et la formation de radicaux libres [58].

2-1-3-L'hémostasie calcique :

La thérapie par la DOX augmente le stress oxydatif et perturbe l'homéostasie du calcium cytosolique, augmente le taux de calcium intracellulaire à partir du réticulum sarcoplasmique par activation du récepteur du ryanodine. L'augmentation du calcium intracellulaire induit la

production des ROS qui augmente le niveau de calcium mitochondrial et perturbe la perméabilité mitochondriale provoquant des libérations de cytochrome c et des facteurs induisant l'apoptose (figure 22) [43].

2-1-4-Liaison avec les phospholipides :

La DOX cible spécifiquement les mitochondries et s'accumule dans ces organites à des concentrations 100 fois plus élevées que dans le plasma. Cette accumulation est attribuée à la nature cationique du DOX [58] qui a une affinité très élevée à la cardiolipine [44], l'un des phospholipides les plus abondants dans la membrane interne de la mitochondrie et qui est nécessaire pour l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire telles que la cytochrome c oxydase et la NADH cytochrome c oxydoréductase [54]. La liaison de DOX à la cardiolipine conduit à la formation d'un complexe irréversible inhibant la phosphorylation oxydante car elle rend la cardiolipine incapable d'agir comme cofacteur pour les enzymes respiratoires mitochondriales [58].

2-1-5-La toxicité des métabolites :

Un autre mécanisme proposé est la formation des métabolites de la DOX. Le doxorubicinol est un métabolite d'alcool primaire C-13 de la DOX qui s'accumule dans le cœur d'une manière dépendante du temps et de la dose [44] et qui peut affecter les fonctions métaboliques des cardiomyocytes, cela interfère également avec la pompe à calcium du réticulum sarcoplasmique, la pompe Na^+/K^+ de Sarcolemma et la pompe à protons F₀F₁ des mitochondries [45]. Le DOXol a également montré qu'il était 50 ± 10 fois plus puissant que le DOX pour inhiber les pompes de calcium et de protons dans un réticulum sarcoplasmique isolé ou des mitochondries [46].

2-2- L'hépatotoxicité :

Un autre site commun pour la mort cellulaire induite par la DOX et les lésions tissulaires est le foie (40% des patients soumis au traitement souffrant d'une forme de lésion hépatique) en métabolisant les concentrations élevées de la DOX induisant la surproduction des ROS [49]. Par conséquent la DOX provoque un stress oxydatif dans le cytosol et les mitochondries des hépatocytes en réduisant significativement le système de défense antioxydant (la CAT, la SOD et GSH) et en augmentant également le niveau du MDA dans les deux compartimentations

cellulaires, résultat d'une peroxydation excessive [59] qui provoque la destruction des structures membranaires (la lyse des cellules hépatiques) et la libération des enzymes hépatiques ASAT, ALAT, Lactate dehydrogenase (LDH) and Alkaline phosphatase dans le sang [52].

2-3-La néphrotoxicité :

La DOX est connue pour provoquer une néphropathie et une protéinurie [49]. L'un des mécanismes de la lésion des tissus rénaux causé par la DOX est les radicaux libres qui provoquent la peroxydation lipidique du glomérule [60] et abaissent les niveaux des antioxydants [52] qui perturbe la fonction physiologique normale des tissus rénaux, générant ainsi des troubles métaboliques [60].

3- La prévention de la toxicité du doxorubicine :

Auparavant, une attention particulière a été accordée à l'utilisation d'antioxydants et de chélateurs du fer pour lutter contre la génération des radicaux libres par la DOX et ses métabolites [45].

Le dexrazoxane un chélateur de fer avec des propriétés antioxydantes puissantes est utilisé pour prévenir la cardiotoxicité induite par la DOX [43]. En plus de la chélation du fer, le dexrazoxane est un inhibiteur catalytique de la topoisomérase II β [42] (figure 23).

Les composés polyphénoliques sont bien connus pour leur activité antioxydante attribuée aux propriétés de balayage des radicaux libres et chélateurs du fer. Les flavonoïdes sont connus pour jouer un rôle protecteur contre la cardiotoxicité induite par DOX [45].

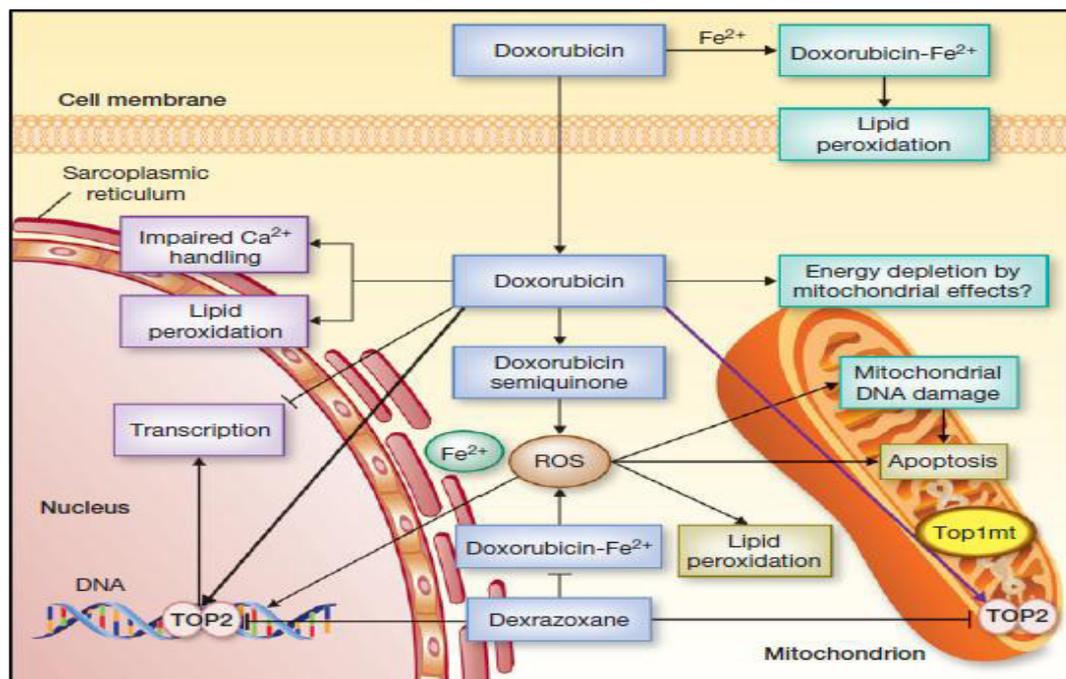


Figure 23 : Le rôle protecteur de la dexrazoxane contre les dommages cellulaires induits par la doxorubicine [42].

La vitamine E possède plusieurs fonctions biologiques, il est bien admis que sa principale fonction *in vivo* est un antioxydant, protégeant les cellules et les tissus contre les dommages oxydatifs principalement de la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres. La vitamine E améliore la toxicité de la DOX sans interférence avec son efficacité en tant qu'agent chimiothérapeutique [44].

3-1- Le rôle protecteur des composés phénoliques contre la toxicité induite par la doxorubicine :

Bien que la DOX soit parmi les agents anticancéreux les plus utilisés, son application clinique est limitée en raison de sa toxicité. La thérapie adjuvante avec un antioxydant a été suggérée comme une stratégie prometteuse pour réduire les effets indésirables induits par la DOX.

Dans ce contexte, de nombreux composés phénoliques ont été signalés pour protéger contre la cardiotoxicité induite par la DOX. Les effets cardioprotecteurs des composés phénoliques sont exercés par de multiples mécanismes, y compris l'inhibition de la génération

d'espèces réactives d'oxygène, de l'apoptose (NF- κ B, p53) de dysfonctionnement mitochondrial et des dommages à l'ADN [61, 5].

Un mécanisme d'action commun pour presque tous les composés phénoliques est l'inhibition du stress oxydatif. Les composés phénoliques peuvent éliminer les radicaux libres et améliorer les mécanismes de défense antioxydants cellulaires dans les cellules. La forte tendance des composés phénoliques à chélater les métaux joue un rôle important dans leur activité antioxydante, les composés possèdent des groupes hydroxyle et carboxyle qui sont capables d'inactiver le fer par chélation. Ce processus supprime en outre la réaction de Fenton, qui est censée jouer un rôle central dans la génération des ROS. En outre, les composés phénoliques piègent le radical alcoyle lipidique et inhibent ensuite la peroxydation lipidique. Cette action dépend du nombre et de la position du groupe hydroxyle dans la structure des molécules.

Les effets protecteurs des composés phénoliques contre l'apoptose des cardiomyocytes induite par la DOX ont également été étudiés de manière approfondie. La surproduction des ROS due à la toxicité du DOX augmente la teneur en Ca^{2+} cytosolique par l'ouverture du récepteur du ryanodine et la libération subséquente de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique dans les cardiomyocytes. La teneur en Ca^{2+} mitochondrial augmente également au-delà d'un seuil après l'élévation du Ca^{2+} cytosolique, ces événements perturbent l'intégrité mitochondriale qui implique la chute du potentiel membranaire mitochondrial (MMP) et par conséquent, la libération de cytochrome c à partir de mitochondries ce qui déclenche l'activation des caspases protéases et la mort cellulaire subséquente. Il a été démontré que de nombreux composés phénoliques peuvent perturber cette voie à différents stades (Figure 24). Par exemple, l'eugénol et le tétrahydroxystilbène glucoside réduisent le Ca^{2+} cellulaire, et la baicaleine et le 6-gingerol conservent efficacement le MMP.

Les propriétés pharmacologiques des composés phénoliques sont principalement attribuées à leurs propriétés chélateurs et antioxydants, ainsi que leurs effets réglementaires des voies de signalisation cellulaire et l'expression des gènes.

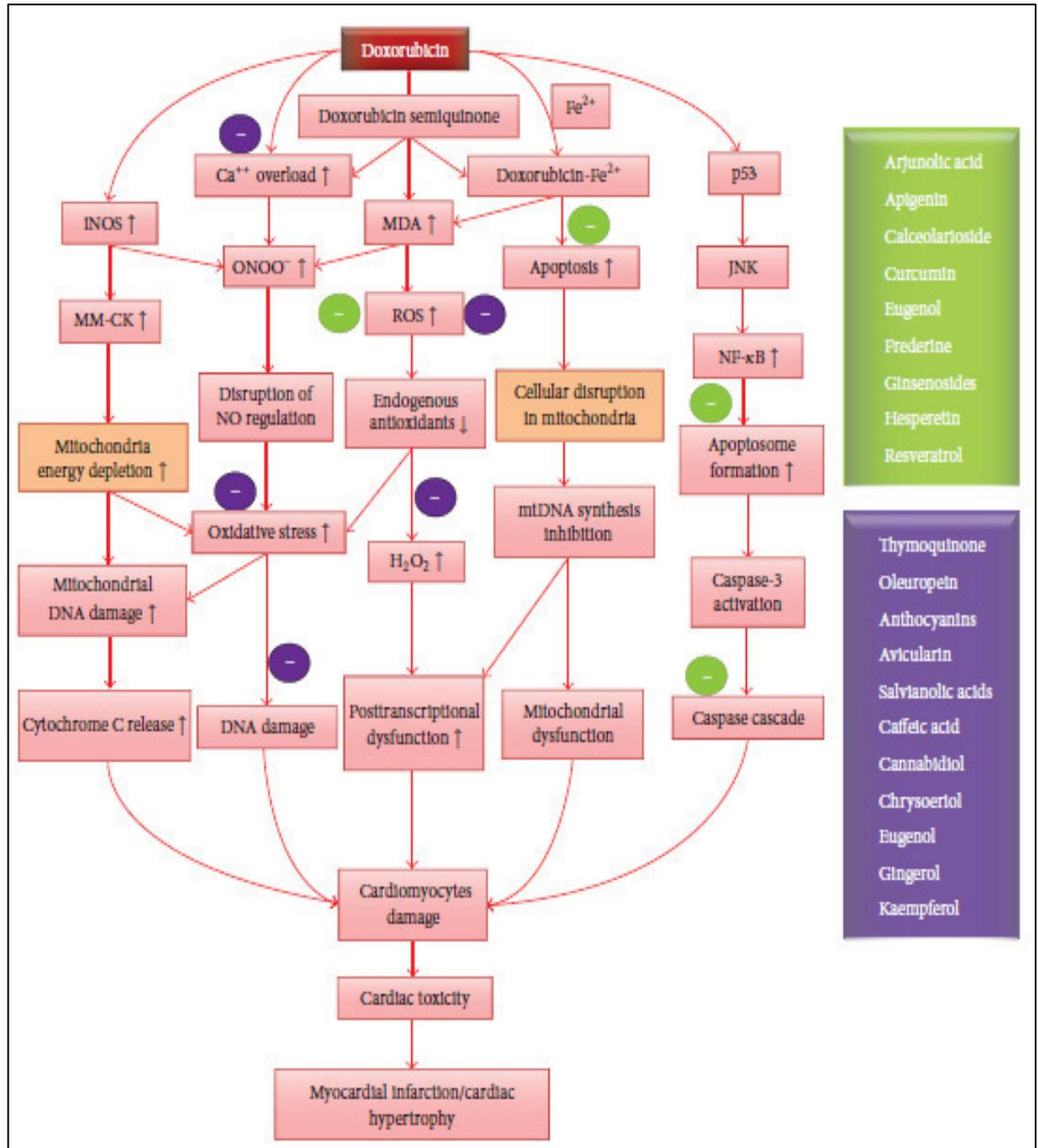


Figure 24 : Le rôle protecteur des composés phénoliques contre la toxicité induite par la doxorubicine [62]

De nombreuses études ont suggéré que l'expression de P53 est impliquée dans l'activité protectrice des composés phénoliques. Les dommages causés par l'ADN, par les ROS ou directement par la DOX peuvent déclencher la protéine suppresseur de tumeur P53 pour induire le gène Bax et finalement pousser la voie intrinsèque d'apoptose.

Certains composés phénoliques tels que l'isorhamnetine, le kaempferol et le resvératrol peuvent inhiber cette activation de P53 induite par la DOX. Le facteur de transcription NF- κ B est un régulateur clé de l'apoptose, de l'inflammation et de la division cellulaire dans une variété de types de cellules. La DOX active le NF- κ B dans les cardiomyocytes néonataux de rats et exerce une action proapoptotique par l'activation des gènes FasL, Fas, c-Myc et P53 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires. La curcumine, le plantainoside D et l'eugénol sont parmi les inhibiteurs de NF- κ B (figure 24). En outre, l'activité antiapoptotique dans les voies intrinsèque et extrinsèque est l'un des effets les plus étudiés des composés phénoliques qui inhibent les cascades de signalisation d'apoptose [61, 62].

Outre l'efficacité des composés phénoliques contre la cardiotoxicité induite par la DOX, il est important de s'assurer que les effets anticancéreux de la DOX ne sont pas minimisés par la co-administration des phénols. Cette question a été abordée dans un certain nombre d'études, et il a été constaté que la baicalein, le chrysoeriol, le kaempferol, le resvératrol, la rutine et la lutéoline n'influençaient pas l'activité antitumorale du DOX.

Il est intéressant de noter que l'isorhamnetin a non seulement un effet protecteur contre la cytotoxicité induite par la DOX, mais a également potentialise son activité anticancéreuse [61].

Les Rosacées sont des herbes vivaces munies de tiges dressées, rampantes ou à stolons (fraisier...), des arbres (cerisier, pêcher...), ou des arbustes (rosier, aubépine...). Ce sont exceptionnellement des plantes annuelles. Il existe environ une centaine de genres et 3000 espèces. La famille des Rosacées existe un peu partout dans le monde, mais de façon prépondérante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord.

1-Les principales sous-familles:

1-1-Agarioidées: fraisier, potentille, framboisier...

1-2-Rosoidées: rosier, églantier...

1-3-Amygdaloïdées ou Prunoïdées: prunier, abricotier, amandier, cerisier...

1-4-Maloïdées: poirier, pommier, cognassier, néflier, sorbier, aubépine...

1-5-Spiroïdées: reine des près...

◆ De nombreuses espèces sont cultivées comme plantes d'ornement:

Buisson-ardent ou *Piracantha*, cotonéaster, *Cotoneaster franchetii*, cognassier du japon, photinia, pommier d'ornement, rosier,...

◆ **D'autres comme plantes alimentaires pour leurs fruits:** cognassier, pêcher, cerisier, prunellier, amandier...,

◆ **D'autres comme plantes médicinales pour leurs feuilles, fleurs ou fruits:** alchémille vulgaire, aubépine, framboisier, églantier, cerisier... [63]

2-Les plantes médicinales

2-1-L'aigremoine (*Agrimonia eupatoria*)

Est une plante médicinale aux nombreuses vertus thérapeutiques, idéal pour calmer la soif des diabétiques et réduire le sucre urinaire. L'aigremoine est préconisée pour les digestions lentes, les crises d'hémorroïdes, l'insuffisance veineuse et les coliques néphrétiques. Elle est aussi utilisée en gargarismes contre l'angine, les enrouements et les extinctions de voix.



Figure 25 : *Agrimonia eupatoria*

L'aigremoine renferment des tanins condensés (catéchine) et des flavonoïdes (lutéoline) ainsi que du terpène, phytostérine, eupatorine, ainsi que de la vitamine K et P et enfin de la silice (plus de 10 %)

Dans l'antiquité, on attribuait à l'aigremoine des vertus étendues contre la cataracte, l'ictère (trouble chez le nouveau-né), la morsure des serpents. Dioscoride, médecin grec, l'utilisait pour soigner les ulcères [64].

2-2- L'aubépine :

Est une plante médicinale du coeur, elle est reconnue pour ses qualités tonifiantes cardiaques et un excellent antispasmodique. L'aubépine est le traitement thérapeutique préconisée pour régularisé le rythme cardiaque et diminuer l'excitabilité nerveuse. Son écorce est fébrifuge et ses baies sont astringente, efficace contre les maux de gorge.

Les feuilles, les fleurs et les fruits de l'aubépine renferment des flavonoïdes, dont l'hypéroside, le rutoside et le spiréoside, des acides triterpéniques, des acides-phénols, des proanthocyanidols, des hétérosides cyanogénétique et des amines aromatiques, en particulier de la triméthylamine dans les fleurs.



Figure 26: Aubépine (*Crataegus* sp)

L'aubépine fait partie des plantes médicinales qui étaient déjà réputées et utilisées à l'époque de la Grèce antique depuis au moins l'an 100 de notre ère. L'aubépine est également employée en Médecine traditionnelle chinoise depuis environ 650 ans avant notre ère, notamment pour traiter les troubles cardiovasculaires. Les Anciens appréciaient sa fleur contre la goutte, la pleurésie, la leucorrhée (perte blanche). Mais déjà, au XVII^e siècle, on la préconisait contre la tension artérielle. Bonnejoy, médecin de campagne au XIX^e siècle, signala ses propriétés antispasmodiques [65].

Les études de Sun et al. 2016 ont montré que la vitexine (est un flavones, l'ingrédient actif de l'extrait de feuilles d'aubépine, à diverses activités biologiques, y compris des actions antioxydantes et anti-inflammatoires) est un agent thérapeutique efficace contre la cardiotoxicité induite par la DOX. Les mécanismes étudiés comprenaient l'atténuation du stress oxydatif, la réduction des cytokines inflammatoires cardiaques et l'inhibition de l'activation de la caspase-3. [66].

2-3-L'abricotier du Japon (*Prunus mume*)

Est une plante médicinale dont le fruit possède de nombreuses propriétés thérapeutiques antibactériennes et antipyrétiques, antispasmodiques et astringentes.



Figure 27: *Prunus mume*

Il est principalement utilisé dans la pharmacopée traditionnelle chinoise sous l'appellation wu mei et soigne les bronchites et la toux même lorsqu'elle est chronique. Il est une plante de la digestion facilitant les indigestions et aidant contre les diarrhées et la dysenterie, il soulage des vomissements dus aux ascaris (parasites intestinaux). Il freine les saignements de toutes sortes ainsi qu'il est efficace sur les infections cutanées.

L'abricotier du Japon renferme de nombreux composés actifs ainsi que du fructose et différentes vitamines A et B ainsi que C, des sels minéraux et des oligo-éléments, de même qu'il contient des tanins [67].

3- *Malus hupehensis*

Est une espèce de pommier de la famille des Rosaceae. Elle est originaire de Chine et de Taïwan. Elle est parfois appelée « pommier du hou-pei ». On trouve, en effet, ce pommier dans la région chinoise de l'Hubei. Néanmoins, on le trouve également dans d'autres régions de Chine.

Les études de Wang et al. 2013 ont montré que l'Avicularin (biflavonoïdes glycoside isolé des feuilles de *Malus hupehensis*) possède des effets protecteurs contre la cardiotoxicité induite par la DOX *in vitro* sur les cellules H9c2 et le mécanisme supposé était via sa propriété antioxydante [68].

**LA DEUXIEME
PARTIE
ETUDE
EXPERIMENTALE**

1-L'extraction de la plante :

La plante a été récoltée au mois d'avril 2014 dans la région de la wilaya de Mila (est algérien) et puis elle a été identifiée par le professeur KAABACHE (université de Sétif).

1-1-Procédures de l'extraction de la plante :

Les parties récoltées (feuilles) ont été séchées à l'abri de la lumière du soleil et d'humidité ensuite broyées et pesées, et en obtiens finalement (800g).

Le matériel végétal a subi une macération dans un mélange hydro alcoolique (Ethanol /Eau) dans la proposition (80/20 ; v/v) pendant 24heures à température ambiante. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure 48, 72 heures successivement afin d'extraire le maximum. Cette opération effectuée à froid permet d'éviter la dégradation des produits thermolabiles.

Après la filtration, l'extrait hydro alcoolique récupéré est concentré sous pression réduite et une température environ de 35°C, à cet extrait, on ajoute 400 mL d'eau distillée après en filtrant sur un Buchner, le filtrat subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole , puis le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

- Ether de pétrole une seule fois (300mL) pour en débarrassé des graisse et de la chlorophylle
- Le chloroforme (3×300mL). La phase organique a été concentrée à sec pour obtenir une masse de (2.13g).
- L'acétate d'éthyle (3×300mL) et après concentration en obtenir une masse de (14.01g).
- Le *n*-butanol (3×300mL), après évaporation nous avons obtenu une masse de (50.78g).

2-Modèle expérimentale in vitro :

2-1-Dosage des polyphénols totaux :

L'extrait *n*-butanol est solubilisé dans le méthanol à une concentration de 1m g/ml pour le dosage des polyphénols totaux. Le taux de polyphénols totaux est déterminé par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le dosage de ces polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Singleton et al. 1999 [69]. 20µL de l'échantillon est mélangé avec 1580 µL d'eau distillée et 300 µL d'une solution de

carbonate de sodium 20 %. Après agitation et d'incubation de cinq minutes, 100 µL du réactif de Folin-Ciocalteu 1 N sont additionnés ; après 30 minutes d'incubation à 40°C, la lecture des densités optiques (DO) est faite à 765 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de 50 à 500 mg/mL.

La concentration des composés phénoliques totaux dans l'extrait a été déterminée en µg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par 1 mg de l'extrait à l'aide d'une équation obtenue à partir d'une courbe standard d'acide gallique.

2-2-Dosage des flavonoïdes totaux :

Le teneur totale en flavonoïdes a été estimé selon la méthode décrite par Wang et al. 2008 [70]. En bref, à 0,5 ml d'échantillon, on a ajouté 0,5 ml de solution à 2% d'AlCl₃. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. Le teneur totale en flavonoïdes a été calculé en µg d'équivalents de quercétine (QE) pour 1 mg de l'extrait à l'aide d'une équation obtenue à partir d'un graphique de la quercétine (standard).

2-3-Test de piégeage du radical libre DPPH :

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon [71]. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$[(A1 - A2)/A1] \times 100$$

A1: absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2:absorbance en présence d'extrait.

L'effet de l'extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Braca et al. 2001 [72]. Un volume de différentes concentrations de l'extrait est ajouté à 3 mL de la solution méthanolique du DPPH (0,004 %) fraîchement préparée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc (méthanol).

➤ **Calcul des concentrations 50 « IC₅₀ » :**

L'IC₅₀ (inhibitory concentration 50% ; concentration inhibitrice à 50 %) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait et le standard (Vitamine C).

2-4-Inhibition de la peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique dans le jaune d'œuf est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Cao et Ikeda, 2009 [73]. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100°C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 532 nm).

3-Modèle expérimental in vivo :

3-1- Animaux et conditions d'hébergement :

Notre étude expérimentale a porté sur des rats *Wistar albinos* adultes, pesant 170 g - 200 g, acclimatées à une température ambiante. Les rats ont eu un régime standard de laboratoire et l'eau est donnée *ad libitum*.

3-2- Toxicité aigüe par la Doxorubicine :

Une toxicité expérimentale est induite par la doxorubicine à raison de 15 mg/kg. Les rats sont répartis en 5 lots expérimentaux à raison de 6 rats par lot:

- témoins (control)
- traité par, la doxorubicine (DOX) par injection intrapéritonéale (1dose) à raison de 15 mg/kg
- traité par l'extrait (Extract) par gavage à raison de 100 mg/kg dissous dans l'eau distillée pendant 10 jours.
- traité par l'extrait et la doxorubicine (Ext+DOX) à raison de 15 mg/kg le 8^{ème} jour.
- traité par la vitamine E par gavage à raison de 100 mg/kg dissous dans l'eau distillée pendant 10 jours et par la doxorubicine (VitE+DOX) à raison de 15 mg/kg le 8^{ème} jour.

3-3-Dosages des paramètres biochimiques :

Les taux plasmatiques de l'urée, de la créatinine, de cholestérol et des triglycérides sont estimés en utilisant les kits BIOMAGHREB. Tant disque, les activités plasmatiques des enzymes TGO, TGP et LDH ont été mesurées en utilisant des kits SPINREACT.

4-Évaluation statistique :

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes \pm écart-types, et analysés par le test *t* de Student. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs

1- Résultats :

1-1-Rendements d'extraction :

L'extraction des flavonoïdes montre que l'extrait *n*-butanol représente le rendement le plus élevé (6.35 %), suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (1.75 %). Le rendement le plus faible est obtenu par l'extrait chloroformique (0.27%) (Tableau 1).

Tableau 1 : Rendement des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
Parties aériennes (800 g)	Chloroforme	2.13	0.27 %
	Acétate d'éthyle	14.01	1.75 %
	<i>n</i> -butanol	50.78	6.35 %

1-2- Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux :

Les résultats obtenus montrent la richesse de l'extrait *n*-butanol en polyphénols et en flavonoïdes dont la teneur est $278 \pm 29,14 \mu\text{g}$ d'équivalents d'acide gallique / mg d'extrait et $54,87 \pm 1,94 \mu\text{g}$ d'équivalents de quercétine /mg extrait respectivement.

1-3-Piégeage du radical libre DPPH :

Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [71]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 514–518 nm. La mesure de l'absorbance (DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 515 nm. À partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées sur la figure 28, qui montrent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de notre extrait. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC_{50}).

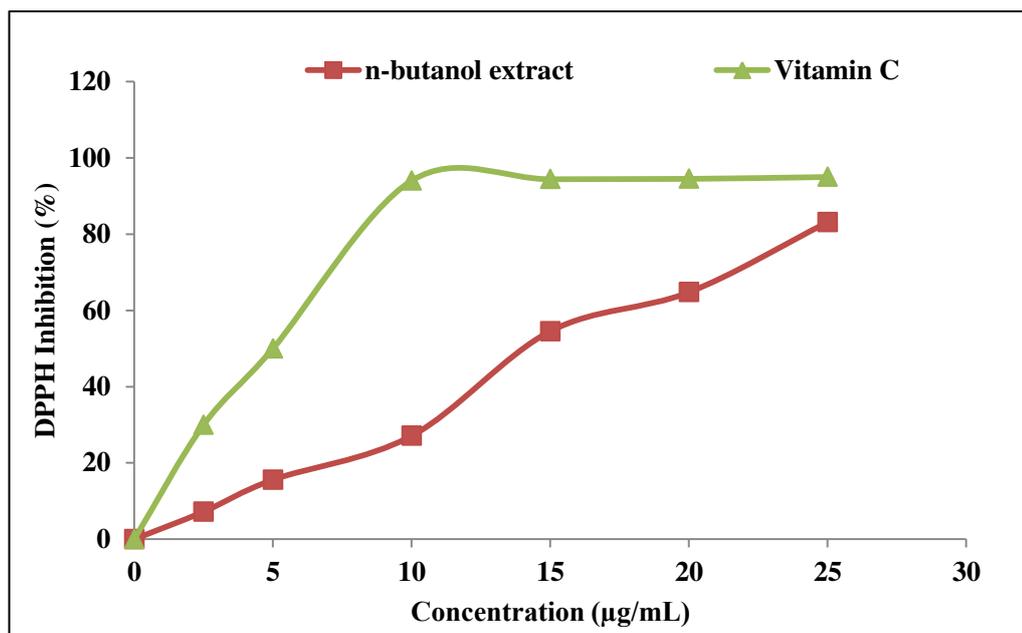


Figure 28 : Pourcentage de l'activité antiradicalaire l'extrait *n*-butanol vis-à-vis du radical libre DPPH, classés selon l'ordre décroissant suivant (25 µg/mL) : vitamine C (96.00 %) > *n*-butanol (81.94 %).

En comparant les IC_{50} de l'extrait testé (15.03 µg/mL) par rapport à celle de la vitamine C (5 µg/mL), nous remarquons que l'activité antiradicalaire de l'extrait est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] de la substance de référence.

1-4-Evaluation *in vitro* de la peroxydation lipidique:

La lecture de la figure 29, montre que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'extrait *n*-butanol et de la vitamine C est dose dépendant. Le pouvoir antioxydant de l'extrait *n*-butanol et de la vitamine C vis à vis du LPO, le plus élevé est observé avec une dose de 500 µg/mL (68.71%) et 300 µg/mL (97%) respectivement.

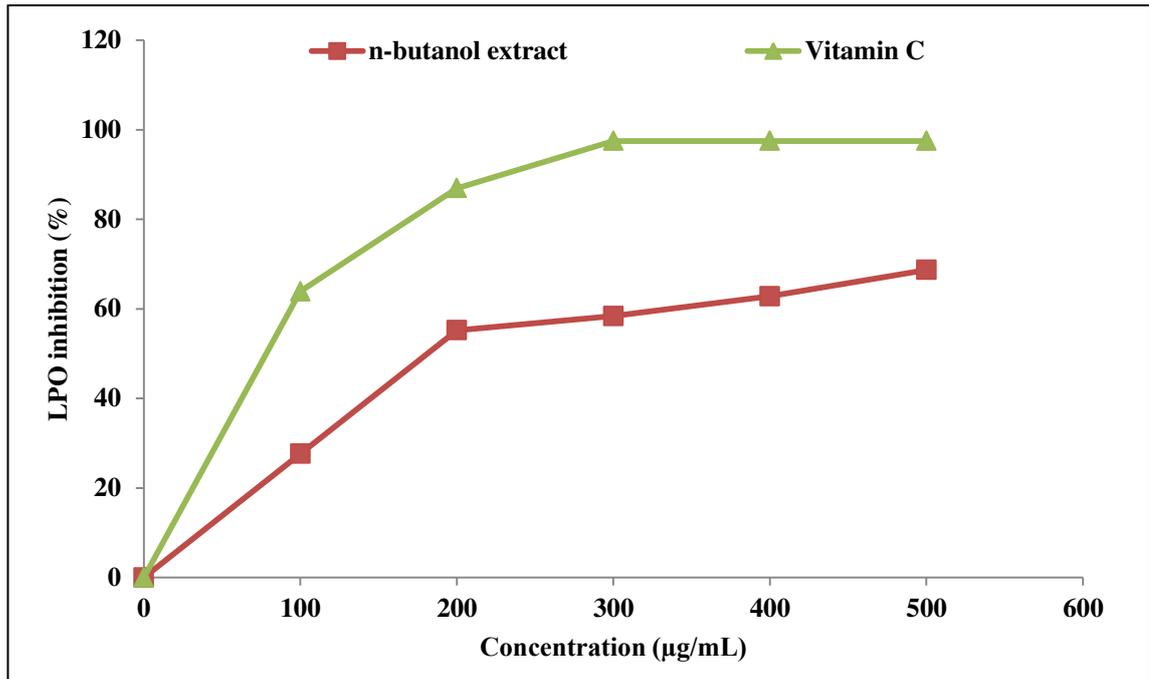


Figure 29 : Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait *n*-butanol et la vitamine C

1-5-Influence du traitement sur la fonction rénale :

Les résultats illustrent une augmentation significative de l'urée et de la créatinine ($P < 0,05$) chez les rats traités par la DOX seul. L'association de la DOX à 15 mg/kg du poids corporel avec l'extrait *n*-butanol ou la vitamine E n'a montré aucune différence significative de l'urée et de la créatinine par rapport au lot témoin (Figure 30).

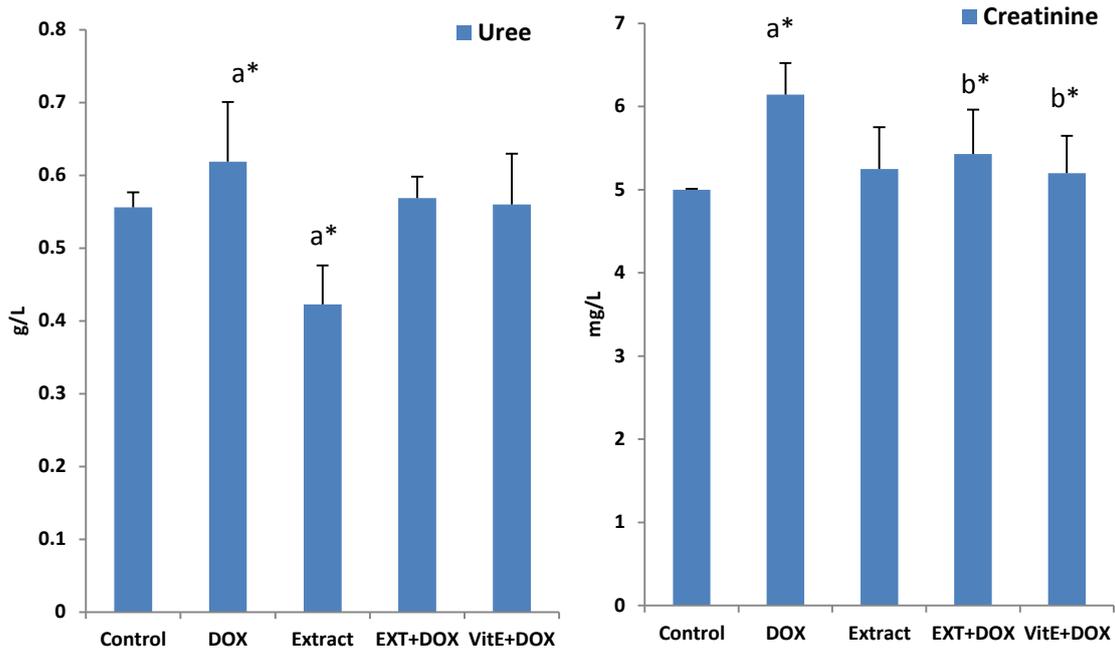


Figure 30: Effet de la DOX, la vitamine E et de l'extrait végétal sur les taux sériques de l'urée et de la créatinine. Les valeurs sont données en moyenne \pm écart type. a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX. Test *t* student : * $p < 0.05$

1-6-Influence du traitement sur la fonction hépatique et cardiaque :

Nos résultats ont révélé une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité enzymatique de l'ALAT, l'ASAT et la LDH chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg) en comparaison avec les rats témoins (Figure 31).

L'administration de l'extrait temporelise l'effet de la DOX et normalise la valeur de ces enzymes contre le groupe traité par la DOX seulement. Chez le groupe traité par l'extrait et la DOX, nous avons constaté une diminution significative du taux sérique d'ASAT, ALAT et LDH. Les mêmes remarques pour le groupe traité par la vitamine E et la DOX (Figure 31). En conséquence, nos études biochimiques ont prouvés que la DOX a causé une hépatotoxicité qui a été empêché par l'extrait butanolique et par la vitamine E.

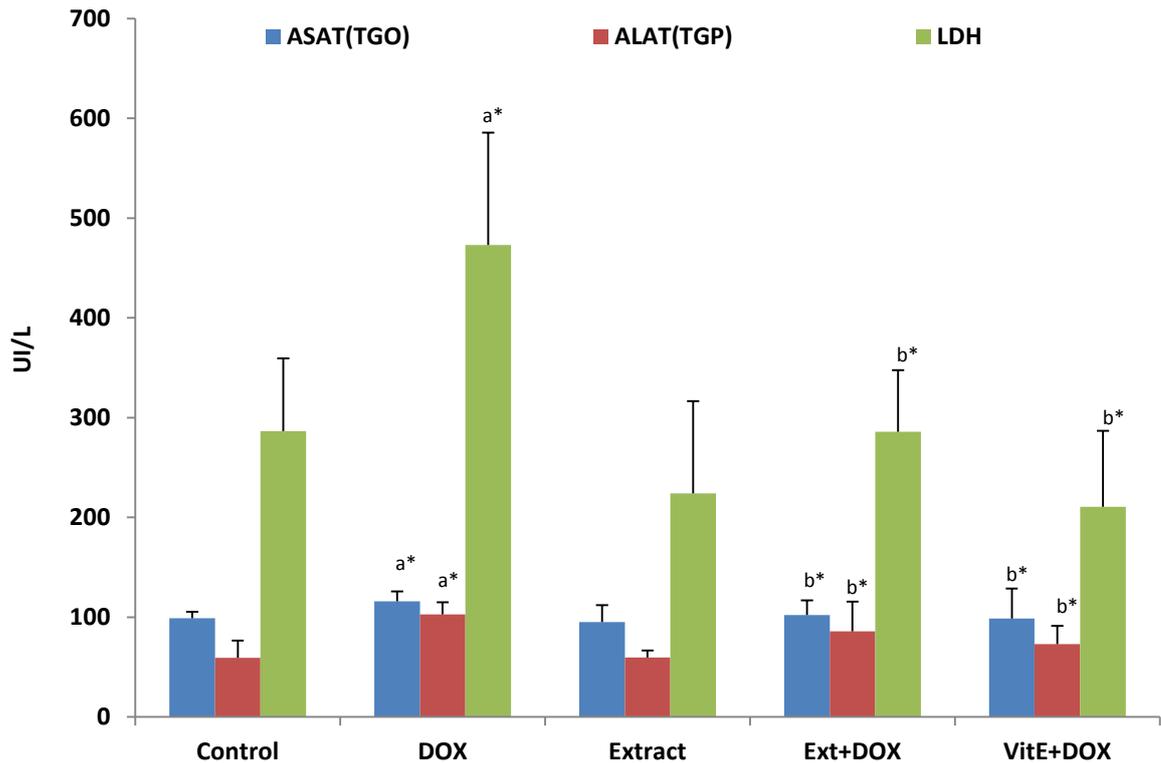


Figure 31: Effet de la DOX, la vitamine E et de l'extrait végétal sur les taux sériques de l'LDH, TGP (ALAT) et de la TGO (ASAT). Les valeurs sont données en moyenne \pm écart type. a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX.

Test *t* student : * $p < 0.05$

1-7-Influence du traitement sur le profil lipidique :

L'exposition des rats au DOX à 15 mg/kg du poids corporel provoque une augmentation significative des triglycérides, du cholestérol et des LDL ($P < 0,05$) et une diminution significative ($P < 0,05$) du HDL en comparaison avec les rats témoins.

Les résultats obtenus montrent aussi une diminution significative du cholestérol ($P < 0,05$), des triglycérides et des LDL chez le groupe traité par la DOX et l'extrait *n*-butanol ou la Vitamine E (figure 32).

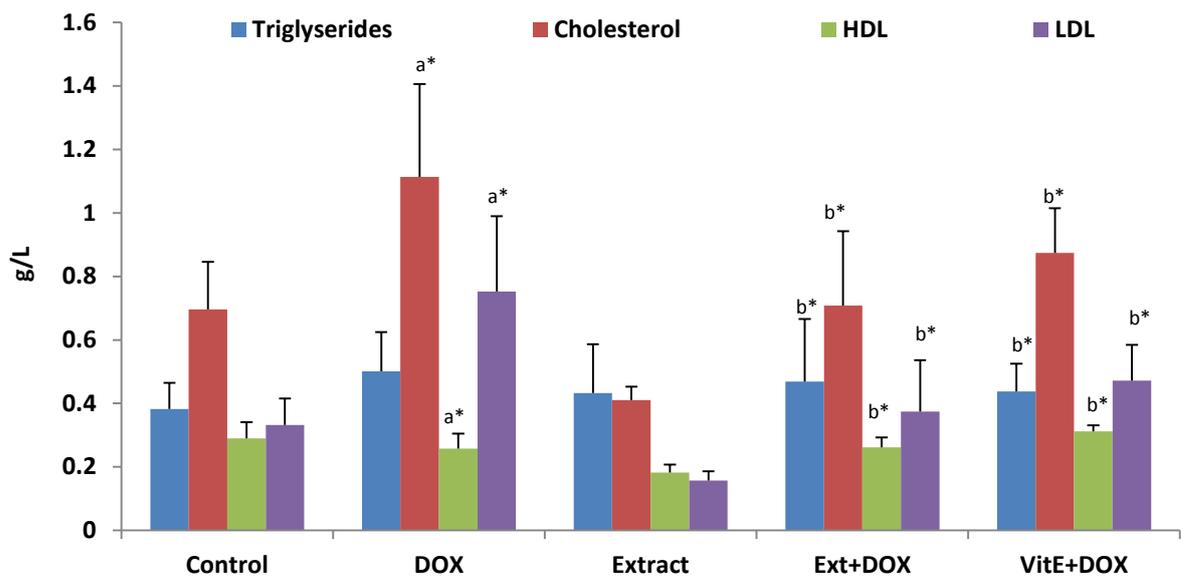


Figure 32 : Effet de la DOX, la vitamine E et de l'extrait végétal sur les taux sériques de cholestérol, LDL, HDL et des triglycérides. Les valeurs sont données en moyenne \pm écart type. a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX.

Test *t* student : * $p < 0.05$

2-Discussion :

Dans la présente étude, le dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux montrent la richesse de l'extrait *n*-butanol en polyphénols et en flavonoïdes. Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies, etc.
- le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante
- la méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux [71].

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure–activité antioxydante des composés phénoliques [71]. Dans notre étude on a comparé les IC₅₀ de l'extrait testé (15.03µg/mL) par rapport à celle de l'acide ascorbique (5µg/mL), on a remarqué que l'activité antiradicalaire de l'extrait est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] de la substance de référence. Il est évident que l'activité de l'extrait *n*-butanol est attribuée à sa richesse aux composés phénoliques (polyphénols et flavonoïde).

Dans notre étude on a évalué l'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait *n*-butanol et la vitamine C. on a constaté que l'inhibition de la peroxydation lipidique exercé par l'extrait due à la diminution de la concentration des radicaux libres produite par le FeSO₄. Ces résultats expliquent la propriété antioxydante des composés phénoliques démontrés dans plusieurs travaux .

L'étude *in vivo*, menée sur des rats de souche *Wistar albinos*, a révélé que l'administration d'une dose unique de la DOX (15 mg/kg) a provoqué une néphrotoxicité caractérisé par une augmentation significative de l'urée et de la créatinine (P<0,05) par apport aux rats témoins. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par des études antérieures [74, 75, 76].

Les résultats obtenus montrent clairement que la DOX a entraîné une altération de la fonction rénale révélée par l'augmentation des niveaux de ses marqueurs dans le sérum (urée et créatinine). Cette néphrotoxicité est probablement due à l'interaction des radicaux libres produit par la DOX avec la membrane cellulaire conduisant à modifier sa perméabilité et à la perte de l'intégrité fonctionnelle dans le rein. L'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol et de la vitamine E a été reflété par les changements des concentrations sériques de l'urée et la créatinine montrant ainsi la capacité de l'extrait *n*-butanol à protéger contre les dommages rénaux induits par la DOX.

Notre étude montre que la DOX a induit une augmentation significative de l'activité des enzymes hépatiques dans le sang (ALAT, ASAT et LDH) qui peut être due à des lésions tissulaires dans le foie, les reins et le cœur ou en raison de modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire [77, 78]. En outre, l'ALAT, l'ASAT et la LDH sont les biomarqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l'étendue des dommages cellulaires et de la toxicité, car ils sont cytoplasmiques et libérés dans la circulation après l'atteinte cellulaire. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Jambhulkar et al. (2014) [78] et Al-Syaad et Ibrahim (2014) [79].

Il est maintenant admis que la toxicité de la DOX repose essentiellement sur une majoration d'un processus oxydatif mettant en jeu la production d'espèces radicalaires. Cette surproduction de radicaux libres induit au niveau de toutes les structures cellulaires une augmentation de la peroxydation lipidique qui conduit à une altération des fonctions membranaires. Cette dernière provoque la libération de LDH et des transaminases hépatiques (ALAT) et cardiaques (ASAT) et leur augmentation significative dans le sang [78].

D'après les résultats obtenus (figure 31), l'administration concomitante du l'extrait végétale et de la DOX a réduit de manière significative l'activité enzymatique de l'ALAT, L'ASAT et la LDH comme dans le cas d'un traitement préventif par la Vit E. Cela révèle la capacité du l'extrait administré simultanément avec la DOX d'atténuer les lésions hépatiques et cardiaque induites par ce dernier. Dans notre étude, le prétraitement avec l'extrait est efficace dans la prévention des dommages hépatiques et cardiaque causés par la DOX. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Chennuru et Saleem (2013) [80].

L'exposition des rats au DOX à 15 mg/kg du poids corporel provoque une augmentation significative des triglycérides, du cholestérol et des LDL ($P < 0,05$) et une diminution significative

($P < 0,05$) du HDL en comparaison avec les rats témoins. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Iliskovic et al. (1997) [81] et Hong et al. (2002) [82]. On distingue aussi que l'extrait *n*-butanol à un pouvoir diminuant de l'excès du cholestérol, des triglycérides et LDL au niveau du sang. Ce résultat est confirmé par l'étude d'Olaleye et al. (2013) [83].

Le cholestérol est une substance lipidique, constituant indispensable de nos membranes cellulaires et précurseur de certaines molécules essentielles au bon fonctionnement de notre métabolisme comme les hormones stéroïdiennes (cortisol, oestrogènes, progestérone...), la vitamine D ou les acides biliaires.... On le retrouve essentiellement au niveau du foie, du cerveau et de la moelle épinière. Si une quantité suffisante de cholestérol est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme, un excès de cholestérol est en revanche néfaste, surtout s'il s'associe à d'autres facteurs de risques comme l'âge, l'hypertension artérielle, le tabac, le diabète est la toxicité médicamenteuse.

Dans le sang, le cholestérol est véhiculé par des transporteurs. Ces transporteurs sont des lipoprotéines. Il existe deux types de lipoprotéines (HDL et LDL) qui, associées au cholestérol, vont donner : – le « bon cholestérol » : cholestérol lié aux HDL – le « mauvais cholestérol » : cholestérol lié aux LDL. La notion de bon ou mauvais cholestérol est liée au rôle de ces lipoprotéines transporteuses. Les lipoprotéines HDL ont un pouvoir protecteur des vaisseaux : elles récupèrent le cholestérol en excès au niveau des artères et des organes et le transportent vers le foie, assurant ainsi le « nettoyage » des vaisseaux sanguins et y limitant les dépôts lipidiques. Le cholestérol HDL est donc le bon cholestérol. A l'inverse, les lipoprotéines LDL transportent le cholestérol du foie vers les cellules de l'organisme et peuvent, au passage, en déposer sur les parois des artères (et ce d'autant plus facilement que le cholestérol se présente sous forme oxydée), favorisant ainsi la formation de plaques de lipides sur les parois artérielles (athéromes) puis leur lésion (sclérose). Les conséquences les plus graves de l'athérosclérose peuvent aller jusqu'à l'accident vasculaire par formation d'un thrombus (caillot) sur la plaque, thrombus qui ralentit puis bloque la circulation. Le cholestérol LDL est donc le mauvais cholestérol, surtout lorsqu'il est oxydé [84].

Dans la présente étude, la capacité de l'extrait végétale de moduler le profil lipidique chez les rats recevant la DOX représente un bon signal de cardioprotection, prise en considération le rôle que joue l'hyperlipidémie dans l'étiologie et la progression de nombreuses

maladies cardiovasculaires. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Subashini et al. (2007) [85].

Conclusion :

Dans notre étude, l'évidence de la toxicité sous l'effet de la DOX est confirmée. Cet anticancéreux est susceptible de causer des dommages profonds aux niveaux tissulaires.

L'ensemble de nos travaux a permis de souligner que l'administration intrapéritonéale de la DOX à une dose unique de 15 mg /kg chez des rats de la souche *Wistar albinos*, provoque une néphrotoxicité qui s'est traduite par une augmentation des taux sériques de l'urée et de la créatinine et aussi une hépatotoxicité et une cardiotoxicité caractérisée par l'augmentation des transaminases (ASAT, ALAT et LDH), cholestérol, triglycérides et LDL dans le sang. D'autre part, nos résultats montrent que l'administration de l'extrait *n*-butanol à une dose de 100 mg/kg avec la DOX provoque une amélioration des taux sériques des paramètres biochimiques.

On peut conclure à partir des résultats ci-dessus que l'extrait *n*-butanol est un antioxydant puissant et joue un rôle important dans la stabilisation de la membrane des cellules cardiaques, hépatiques et rénales ainsi que la stabilisation de profil lipidique (par son effet hypolipidémiant), ce qui lui permet d'agir en tant que cardioprotecteur, néphroprotecteur et hépatoprotecteur.

Références bibliographiques :

- [1] **Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S (2014).** Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 1845(1) : 84-89.
- [2] **Biondo LA, Lima Junior EA, Souza CO, Cruz MM, Cunha RDC, Alonso-Vale MI, Oyama LM, Nascimento CM, Pimentel GD, Dos Santos RV, Lira FS, Rosa Neto JC (2016).** Impact of Doxorubicin Treatment on the Physiological Functions of White Adipose Tissue. *PLoS One.*11(3):e0151548.
- [3] **Alyane M, Bengudeour L, Kebsa W, Boussenane HN, Rouibah H, Lahouel M (2008).** Cardioprotective effects and mechanism of action of poyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity, *Pakistan journal of pharmaceutical sciences.* 21 : 207-208.
- [4] **Delemasure S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L (2006).** Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines : approche fondamentale des mécanismes mis en jeu ; relations avec les données cliniques. *Annales de cardiologie et d'Angéiologie.* 55(2) : 104-112.
- [5] **Abushouk AI, Ismail A, Salem AMA, Afifi AM, Abdel-Daim MM (2017).** Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 90 : 935-946.
- [6] **Favier A (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.*108-115.
- [7] **Haleng J, Pince mail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liège.*62 (10) : 628-638.
- [8] **Morena M, Martin-Mateo M, Cristol J.-P, Canaud B (2002).** Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie.* 23 : 201-208.
- [9] **Defraigne JO, Pincemail J (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège.* 63 : 10-19.
- [10] **Pincemail J, Heusele C, Bonté F, Limet R, Defraigne JO (2001).** Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int. Métabolismes - Hormones – Nutrition.* V (4) : 158-164.
- [11] **Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* 74 (7): 636–643.

- [12] Migdal C, Serres M (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences*. 27 : 405-412.
- [13] Gardés-Albert M, Bonne font-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique*. 91-96.
- [14] Cillard J, Cillard P (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*. 13 (1) : 24-29.
- [15] Bidie AP, N'Guessan BB, Yapo AF, N'Guessan JD, Djaman AJ (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8 (1-2): 1 – 11.
- [16] Grandjean D (2005). Prévention nutritionnelle du stress oxydatif cellulaire. Antioxydants: mode ou réalité biologique? *Le nouveau praticien vétérinaire*. 145 : 61.
- [17] Menvielle-Bourg F J (2005). Le superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie Springer*. 3(3): 118-121.
- [18] Pincemail J, Defraigne J (2008). Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. 8 : 55-60.
- [19] Defraigne JO (2005). Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète ? *Revu Med Liège*. 60 (5-6) : 472-478.
- [20] Chepda T, Perier C, Chamson A, Frey J (1999). Effets pro- et antioxydants de l'ascorbate. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 13 (2) :115-120.
- [21] Baudin B (2006). Stress oxydants et pathologies cardiovasculaires. *Mt cardio*. 2 (1) : 43-52
- [22] Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F (2004). Polyphénols végétaux, sources utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif .*Phytothérapie*. 2(1) : 3-6
- [23] Boizot N, Charpentier J-P (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. 79-82.
- [24] Sanchez-moreno C (2002). Polyphenolic compounds: Structure and classification. Presence in foodstuff and consumption. Biodisponibility and metabolism. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. 329 : 19-27.
- [25] Li A, Li S , Zhang Y-J , Xu X-R , Chen Y-M , Li H-B (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*. 6(12), 6020-6047.
- [26] Iuthria D (2006). Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(14):2266 -2272

- [27] **Hemingway RW, Lak PE (1992)**. Plant poly phénols : synthesis, properties, significance. Plenum Press, New York. P 639-690
- [28] **Hopkins WG (2003)**. Physiologie végétale. DE BOECK SUPERIEUR. page280
- [29] **Anjum S, Sundaram S, Rai G.K (2014)**. Nutraceutical application and value addition of banana peel: a review. Int J Pharm Pharm Sci, 6(Issue 10) : 81-85.
- [30] **Mlambo V, Marume U, Gajana C.S (2015)**. Utility of the browser's behavioural and physiological strategies in coping with dietary tannins: Are exogenous tannin-inactivating treatments necessary. S. Afr. j. anim. Sci. 45 (5) :441-451
- [31] **Grassi D, Desideri G, Ferri C (2010)**. Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis. Nutrients. 2(8) : 889-902.
- [32] **Harbome JB, Marby H, Marby T J (1975)**. The flavanoids. London : Chapman & Hall. P X.
- [33] **Nishiumi SH, Miyamoto SH, Kawabata³ K, Ohnishi K, Mukai R, Murakami A, Ashida H, Terao J (2011)**. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. Frontiers in bioscience. 3(4) :1332-62.
- [34] **Ghedira K (2005)**. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. 3 (4): 162–169.
- [35] **Cook NC, Samman S (1996)**. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutritional biochemistry. 7(2) : 66 -76.
- [36] **Bahorun, T (1998)**. Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius. 83-94
- [37] **Pandey KB, Rizvi SI (2009)**. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2(5).270-278.
- [38] **Monsuez J-J (2009)**. Complications cardiaques des chimiothérapies anticancéreuses : aspects cliniques. La Lettre du Cardiologue. 421 : 16-20.
- [39] **El-Sayyad H I, Ismail M F, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur R L, Fernando A, Raj MHG, Ouhtit A (2009)**. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-flurouracil (5-FU) on the liver of male albino rats.International. Journal of Biological Sciences. 5(5) : 466-473.
- [40] **Andrieu-Abadie N, Levade T , LaurentG, Hatem S, Mercadier JJ (1999)**. La céramide à l’origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine ? Médecine/Sciences. 15 (11): 1322-1324.

- [41] **Zbinden S, Bühlmann M, Aebi S, Suter M T (2010).** Effets indésirables cardiovasculaires du traitement médicamenteux moderne du cancer. *Forum Med Suisse.* 10(8) : 143–147.
- [42] **Nitiss KC, Nitiss JL (2014).** Twisting and Ironing: Doxorubicin Cardiotoxicity by Mitochondrial DNA Damage. *Clin Cancer Res.* 20(18) : 4737-4739.
- [43] **Alkuraishy HM, Al-Gareeb AI., Al-hussaniy HA (2017).** Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanism and Protection by Conventional Drugs and Natural Products. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research.* 2(2) : 31-44.
- [44] **Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. (2002).** Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology.* 180(1) : 79-95.
- [45] **Kwatra M, Kumar V, Jangra A, Mishra M, Ahmed S, Ghosh P, Vohora D, Khanam R (2016).** Ameliorative effect of naringin against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats. *Pharm Biol.* 54(4). 637–647.
- [46] **Minotti G, Parlani M, Salvatorelli E, Menna P, Cipollone A, Animati F, Maggi CA, Manzini S (2001).** Impairment of myocardial contractility by anticancer anthracyclines: role of secondary alcohol metabolites and evidence of reduced toxicity by a novel disaccharide analogue. *British Journal of Pharmacology.* 134 (6): 1271-1278.
- [47] **Cutts S M, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR (2005).** The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life.* 57(2) : 73 – 81.
- [48] **Wallace KB (2003).** Doxorubicin-Induced Cardiac Mitochondriopathy. *Pharmacology & Toxicology.* 93(3) : 105–115.
- [49] **Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR (2013).** Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Royal Pharmaceutical Society. J Pharm Pharmacol.* 65 (2) : 157-170
- [50] **Riddick DS1, Lee C, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, Patterson AV, Stratford IJ, Morrow CS, Townsend AJ, Jounaidi Y, Chen CS, Su T, Lu H, Schwartz PS, Waxman DJ. (2005).** Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 33(8):1083-96.
- [51] **Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. (2011).** Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 21(7) : 440–446.
- [52] **Amandeep K, Manpreet K, Sunil K, Ramica S, Rana A. C. (2012).** Doxorubicin: a critical review on toxicity. *Journal of Pharmacy Research.* 5(5) : 2890-2894.

- [53] **Xu X, Persson HL, Richardson DR. 2005** Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol.* 68(2): 261-71.
- [54] **Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. (2014).** Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 34(1):106-135.
- [55] **Castel M, Despas F, Modesto A, Gales C, Honton B, Galinier M, Senard J-M, Pathak A (2013).** Effets indésirables cardiaques des chimiothérapies. *La Presse Médicale.* 42 (1) : 26-39.
- [56] **Shouman SA, Noimi FM, Gashlan HM (2006).** Evaluation of the potential protective effect of captopril against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J. Egypt. Soc. Toxicol.* 35: 123-129.
- [57] **Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, Hakim G (2002).** Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1567 : 150– 156.
- [58] **Govender J, Loos B, Marais E, Engelbrecht AM (2014).** Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review of the protective role of melatonin. *J Pineal Res.* 57(4):367-80
- [59] **Kebsa W, Rouibah H, Lahouel M. (2014).** Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 27 (6) :1891-1897.
- [60] **Liu L, Zhao YF, Han WH, Chen T, Hou GX, Tong XZ. (2016).** Protective effect of antioxidant on renal damage caused by doxorubicin chemotherapy in mice with hepatic cancer. *Asian Pac J Trop Med.* 9(11) : 1101–1104.
- [61] **Razavi-Azarkhiavi K, Iransahy M, Sahebkar A, Shirani K, Karimi G (2016).** The Protective Role of Phenolic Compounds Against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: A Comprehensive Review. *Nutr Cancer.* 68(6) : 892-917.
- [62] **Ojha S, AlTae H, Goyal S, Mahajan U B, Patil C R, Arya D S, Rajesh M (2016).** Cardioprotective Potentials of Plant-Derived Small Molecules against Doxorubicin Associated Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:5724973
- [63] <https://www.via-les-herbes.com/les-plantes-famille-rosacees/>
- [64] https://www.complements-alimentaires.co/aigremoine/#aigremoine_principaux_constituants
- [65] https://www.complements-alimentaires.co/aubepine/#aubepine_principaux_constituants

- [66] Sun Z, Yan B, Yu, W Y, Yao X, Ma X, Sheng G, & Ma Q (2016). Vitexin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via the suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis and the activation of FOXO3a. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(3) : 1879–1884.
- [67] https://www.complements-alimentaires.co/abricotier-du-japon/#abricotier_du_japon_principaux_constituants
- [68] Wang SQ, Zhu XF, Wang XN, Shen T, Xiang F, Lou HX (2013). Flavonoids from *Malus hupehensis* and their cardioprotective effects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells. *Phytochemistry*. 87:119-25.
- [69] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. In: Packer L, editor. *Methods in enzymol: oxidant and antioxidants (part A)*, vol. 299. San Diego, CA: Academic Press. 152–78.
- [70] Wang H, Dong Gao X, Zhou GC, Cai L, Yao WB (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem* .106 : 888-895.
- [71] Bentabet N, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*. 12(6) : 364–371.
- [72] Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod I*. 64:892-895.
- [73] Cao U, Ikeda I (2009). Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selinious ester and surfated xyloglucan. *Int.J. Biol. Macromol*. 45:231-235
- [74] Refaie MM, Amin EF, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM (2016). Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *J Toxicol* : 9507563.
- [75] Rashid S, Ali N, Nafees S et al (2013). Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(5): 337–345.
- [76] Mohan M, Kamble S, Gadhi P, Kasture S (2010). Protective effect of *Solanum torvum* on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 1, pp. 436–440.

- [77] **Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, Koti BC, Manjula DV(2012)**. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 44(1):73-77.
- [78] **Jambhulkar S, Deshireddy S, Jestadi D B, Periyasamy L (2014)**. Quercetin Attenuating Doxorubicin Induced Hepatic, Cardiac and Renal Toxicity in Male Albino Wistar Rats. *AJPCT*. 2 (8) : 985-1004
- [79] **Al-Syaad K, Ibrahim E H (2014)**. The protective effects of the aqueous extract of saliva against biochemical and histopathological changes in kidney and liver of male rats treated with the anticancer drug doxorubicin. *RJPBCS*. 5(6) : 237-245.
- [80] **Chennuru A, Saleem M T. S (2013)**. Antioxidant, Lipid Lowering, and Membrane Stabilization Effect of Sesamol against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Experimental Rats. *BioMed Research International*. 2013:934239
- [81] **Iliskovic N1, Singal PK (1997)**. Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin -induced heart failure. *Am J Pathol*.150(2) :727-34.
- [82] **Hong YM, Kim HS, Yoon HR (2002)**. Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine. *Pediatr Res*. 51(2) : 249-55.
- [83] **Olaleye TM, Komolafe K, Akinmoladun F, Akindahunsi A (2013)**. Methanolic Leaf Extract of *Parkia biglobosa* Protects against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in rats. *Planta Med* .79 - PJ34
- [84] <http://www.lxbio.fr/cholesterol-et-triglycerides/>
- [85] **Subashini R, Ragavendran B, Gnanapragasam A, Kumar Yogeeta S, Devaki T (2007)**. Biochemical study on the protective potential of *Nardostachys jatamansi* extract on lipid profile and lipid metabolizing enzymes in doxorubicin intoxicated rats. *Pharmazie* 62: 382–387.

Résumé

La doxorubicine (DOX) est un médicament anticancéreux utilisé dans le traitement de nombreuses maladies malignes. Cependant, son utilisation clinique est limitée en raison de plusieurs effets secondaires comme la cardiotoxicité, la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité. Dans la présente étude, nous avons étudié l'efficacité protectrice de l'extrait *n*-butanol d'une plante médicinale de la famille des Rosacées contre la toxicité cardiaque, rénale et hépatique induite par la DOX chez des rats Wistar femelles en utilisant des paramètres biochimiques.

Les rats ont été soumis à un traitement oral pré- et post-phylactique concomitant d'extrait *n*-butanol (100 mg / kg b.wt.) contre la toxicité induite par injection i.p. unique de la DOX (15 mg / kg b.wt). La néphrotoxicité et l'hépatotoxicité ont été évaluées en mesurant les taux sérique de la créatinine, d'urée, d'AST, d'ALT et de LDH. Le profil lipidique a également été mesuré.

Le traitement par l'extrait *n*-butanol a considérablement diminué les taux des marqueurs sérique de la toxicité provoqué par la DOX. Les résultats biochimiques montrant que la DOX a causé des dommages importants au niveau des tissus étudiés qui ont été inversés par l'extrait *n*-butanol. Les résultats suggèrent que l'extrait *n*-butanol atténue les lésions rénales, cardiaques et hépatiques induites par la DOX.

Les tests antioxydant *in vitro* (piégeage de DPPH et inhibition du LPO) de l'extrait butanolique ont indiqué que l'extrait joue le rôle de scavengers des radicaux libres, de plus ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux.

Mots-clés: Rosaceae; Extrait *n*-butanol; Polyphénols; Antioxydant; Doxorubicine; Néphrotoxicité; Hépatotoxicité; Cardiotoxicité.

Abstract

Doxorubicin (DOX) is an anticancer drug used in the treatment of many human malignancies. However, its clinical use is limited because of several side effects like cardiotoxicity, nephrotoxicity and hepatotoxicity. In the present study, we investigated the protective efficacy of *n*-butanol extract of Rosaceae medicinal plant against DOX-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in female Wistar rats using biochemical approaches.

Rats were subjected to concomitant pre- and post-phyllactic oral treatment of *n*-butanol extract (100 mg/kg b.wt.) against the toxicity induced by single i.p. injection of DOX (15 mg/kg b.wt). Nephrotoxicity and hepatotoxicity were assessed by measuring the level of serum creatinine, urea, AST, ALT and LDH. Lipid profile was also measured.

Treatment with *n*-butanol extract significantly decreased the levels of serum toxicity markers. The biochemical results showing that DOX caused significant structural damage to kidney and liver tissue which were reversed with *n*-butanol extract. The results suggest that *n*-butanol extract attenuated renal, cardiac and hepatic damage induced by DOX.

Antioxidant activities of *n*-butanol extract were studied *in vitro*. The inhibition of the formation of malondialdehyde (MDA) and the scavenging of DPPH were assayed. The total phenolic and flavonoid contents of the extract were determined. The extract showed a high antioxidant effects which are strongly correlated with the total flavonoid and phenol contents.

Keywords: Rosaceae; *n*-butanol extract; Polyphenols; Antioxidant ; Doxorubicin ; Nephrotoxicity; Hepatotoxicity ; Cardiotoxicity.

المخلص

يعتبر الدوكسوروبيسين (DOX) دواء مضاد للسرطان يستخدم في علاج العديد من الأمراض الخبيثة. ومع ذلك، استخداماته السريرية محدودة بسبب العديد من الآثار الجانبية أهمها السمية القلبية، الكبدية والكلى. لذا تناولت هذه الدراسة التأثير الوقائي للمستخلص البيتانولي لنبات طبي من عائلة الورديات ضد سمية القلب، الكلى والكبد الناجم عن دواء DOX لدى إناث الجرذان Wistar وتتبع الأثر السمي لهذا الدواء وما يترتب عنه من اضطرابات بيوكيميائية .

لهذا الغرض تعطى الجرذان دواء DOX (15 ملغ/كغ) عن طريق الحقن تحت الصفاق في اليوم الثامن أو المستخلص البيتانولي (100 ملغ/كغ) عن طريق الفم قبل و بعد حقن دواء DOX حتى اليوم العاشر. اذ نقوم بدراسة الاضطرابات في مسارات الاستقلاب المحرض بدواء DOX من خلال تقدير تركيز إنزيمات AST، ALT، LDH، الكرياتينين، اليوريا، الكولسترول، الجليسيريدات الثلاثية، LDL و HDL . تشير نتائج الدراسة البيوكيميائية و الإنزيمية إلى حدوث خلل في العمليات الاستقلابية و يترجم ذلك بارتفاع معنوي في المؤشرات المدروسة. حيث أدت المعاملة بالمستخلص البيتانولي إلى الوقاية من هذه الاضطرابات. توحى النتائج الى أن المستخلص البوتانولي خفف من الأضرار الكلوية والقلبية والكبدية الناجمة عن دواء DOX.

كما تناولت هذه الدراسة تقييم النشاط البيولوجي للمستخلص البيتانولي (*in vitro*)، وذلك من خلال دراسة دورها المضاد للأكسدة (اقتناص جذور DPPH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات)، بالإضافة إلى تقدير كمية المركبات الفينولية والفلافونويدات. تبين النتائج احتواء المستخلص البيتانولي على كمية معتبرة من المركبات الفينولية والفلافونويدات، التي يمكن أن تقتنص بكفاءة الجذور الحرة. و يرجع ذلك إلى قدرتها على إعطاء الهيدروجين، و ذلك من خلال اقتناص جذور DPPH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات.

الكلمات المفتاحية: عائلة الورديات, المستخلص البيتانولي, المركبات عديدة الفينولات, مضاد الاكسدة, دوكسوروبيسين, السمية الكلوية, السمية الكبدية, السمية القلبية.

Amedjoudj Nour El Houda

DATE DE SOUTENENCE

Bounab Romaiassa

01/07/2017

Menzer Meriem

**Titre : Les polyphénols de l'extrait *n*-butanol d'une plante médicinale de la famille des Rosacées:
Evaluation de leur pouvoir antioxydant et protecteur vis-à-vis la toxicité de la doxorubicine.**

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master 2

Résumé

La doxorubicine (DOX) est un médicament anticancéreux utilisé dans le traitement de nombreuses maladies malignes. Cependant, son utilisation clinique est limitée en raison de plusieurs effets secondaires comme la cardiotoxicité, la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité. Dans la présente étude, nous avons étudié l'efficacité protectrice de l'extrait *n*-butanol d'une plante médicinale de la famille des Rosacées contre la toxicité cardiaque, rénale et hépatique induite par la DOX chez des rats Wistar femelles en utilisant des paramètres biochimiques.

Les rats ont été soumis à un traitement oral pré- et post-phylactique concomitant d'extrait *n*-butanol (100 mg / kg b.wt.) contre la toxicité induite par injection i.p. unique de la DOX (15 mg / kg b.wt). La néphrotoxicité et l'hépatotoxicité ont été évaluées en mesurant les taux sérique de la créatinine, d'urée, d'AST, d'ALT et de LDH. Le profil lipidique a également été mesuré.

Le traitement par l'extrait *n*-butanol a considérablement diminué les taux des marqueurs sérique de la toxicité provoqué par la DOX. Les résultats biochimiques montrant que la DOX a causé des dommages importants au niveau des tissus étudié qui ont été inversés par l'extrait *n*-butanol. Les résultats suggèrent que l'extrait *n*-butanol atténue les lésions rénales, cardiaques et hépatiques induites par la DOX.

Les tests antioxydant *in vitro* (piégeage de DPPH et inhibition du LPO) de l'extrait butanolique ont indiqué que l'extrait joue le rôle de scavengers des radicaux libres, de plus ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux.

Mots-clés: Rosacées; Extrait *n*-butanol; Polyphénols; Antioxydant; Doxorubicine; Néphrotoxicité; Hépatotoxicité; Cardiotoxicité.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie faculté de science de la nature et de la vie, Université frères Mentouri Constantine

Président du jury : Zama Djamila (Pr- UFM Constantine).

Rapporteur : Amrani Amel (MCA- UFM Constantine).

Examineurs : Boulkandoul Ramzi (MAA- UFM Constantine).
Tour Hanifa (MAA- UFM Constantine).

