



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  
Département de la Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
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 :**

---

**Évaluation de l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait *n*-butanol  
de la plante *Crataegus* sp vis-à-vis des dommages testiculaires induits  
par la doxorubicine chez les rats**

---

**Présenté et soutenu par:** Belahcene Samia  
Derbal Ilham  
Bouzahzah Ibtissam

**Le : 04/09/2019**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Lalaoui Korichi (Pr- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Amrani Amel (MCA- UFM Constantine).

**Examineurs :** Boubekri Nassima (MCB- UFM Constantine).

Ihouel Safia (MCB- UFM Constantine).

**Année universitaire  
2018-2019**

## Remerciements

« Il ya deux points critiques dans chaque vol : son début et sa fin, et ce qui semble être une fin peut-être c'est l'opportunité d'un nouveau départ »

Au nom de Dieu clément et miséricordieux, grâce à qui nous sommes réunis pour réaliser ce modeste travail scientifique qui nous a donné une très belle récompense, celle d'avoir l'honneur de présenter aujourd'hui ce document enrichissant qui est le fruit d'un effort assidu.

Nos vifs remerciements s'adressent à notre **cher encadreur** Madame **Amrani Amel** (maître de conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine-1), qui nous a proposé ce sujet. On la remercie tout particulièrement pour le temps qu'elle nous a consacré, pour la confiance qu'elle nous a accordée, pour sa compréhension, sa patience, ses relectures et ses conseils précieux. On la remercie profondément pour ses encouragements dans les moments de doute, pour sa disponibilité à tout instant et pour ses orientations judicieuses, le chemin aurait été beaucoup plus ardu sans sa présence. Puissiez-vous trouver notre profonde reconnaissance.

Notre profonde gratitude va également à Monsieur **Lalaoui Korichi**, professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine-1, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de soutenance de notre mémoire et d'apporter ses regards d'expert sur ce travail.

Nos remerciements les plus intenses s'adressent à Madame **Boubekri Nassima**, maître de conférences B à l'université des Frères Mentouri Constantine-1 pour l'immense privilège qu'elle nous a fait en acceptant de participer au jugement de cette mémoire.

Nos remerciements vont également à Madame **Ihouel Safia**, maître de conférences B à l'université des Frères Mentouri Constantine-1 pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'être examinatrice au jury de notre mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Monsieur **Loumaissi Nacer Eddine**, Professeur au service d'Anatomie pathologique à l'hôpital militaire HMRUC/5° RM, qui nous a donné l'opportunité d'effectuer un stage dans les meilleures conditions.. Nous tenons à lui exprimer nos plus sincères remerciements pour l'intérêt manifesté, la chaleur de son accueil, la confiance témoignée et le soutien constant accordé durant le stage.

Un énorme merci pour l'ensemble des membres de l'équipe du département de l'anatomie au CHU pour toute aide précieuse apportée en histologie, tout en citant les médecins anatomopathologistes : Docteur **Boukhenaf Meriem**, Docteur **Araar Karim** et sans oublier le Chef du laboratoire Monsieur **Yekhlef Yazid**.

Nos remerciements sont dirigés également à Monsieur **Abbas Fechit**, Docteur en informatique à université Abderrahmane Mira - Bejaia pour son énorme soutien et sa bonne humeur. Il a été toujours disponible pour nos innombrables questions.

Un grand merci à toute personne qui nous a donné la main pour finaliser l'élaboration de notre mémoire, particulièrement : la doctorante **Mecheri Amira**, pour ses conseils, sa serviabilité et

l'ambiance qu'on a entretenue quotidiennement au laboratoire. On remercie également toute l'équipe du département de Biologie Animale, sont l'une des raisons de succès de ce travail.

## Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à mes **chers parents** pour la qualité de l'éducation qu'ils m'ont conféré et les vertus qu'ils ont cherché à développer en moi. Ils m'ont inculqué le sens de l'abnégation, je leur exprime ici toute mon affection, tout mon amour et toute ma gratitude pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mes études, et aujourd'hui encore.

A l'une des raisons de mon succès Madame **Ameddah Souad** (Professeur à Université des Frères Mentouri Constantine 1) que je ne sais absolument comment je pourrai la remercier face à sa noblesse, une femme juste, patiente, serviable et très compréhensive, j'avais un très grand honneur d'être une de ses étudiants. Je t'en suis éternellement reconnaissante.

Je dédie ce fruit pour Madame **Le Majeur Boudouani Fatima zahra** pour son aide précieuse, sa serviabilité, sa gentillesse et son énorme soutien. Puissiez-vous trouver ici ma profonde gratitude.

Je dédie cet humble ouvrage à mon frère « **Fouad** », et à mes sœurs : « Aicha, Sihem et Nora », ils ont été toujours fiers et comblés de joie en me voyant réussir mes études.

Je dédie ce travail à mes copines : Wissal, Racha, Houda, Nadjiba et Takoua qui ont été toujours à mes côtés pour m'encourager et me soutenir.

A mon petit neveu Mohamed Ibrahim et mes petites adorables nièces : Noor Djihan, Lina, Tasnim et Meriem El Batoul

Je dédie ce fruit d'un long travail assidu à toute personne qui a cru à mes capacités et m'avait encouragé et motivé pour faire mon mieux.

Que ceux ou celle que j'ai omis de remercier m'en excusent.

***BELAHCENE Samia***

## Dédicace :

Nous dédions ce modeste travail à nos chers parents qui nous ont laissé trouver notre voie sans essayer de nous influencer, ils nous ont soutenu tout au long de nos études par leur présence, leur amour, leur attention et surtout leurs sacrifices afin de nous procurer la meilleure atmosphère.

A nos grands-parents, à nos oncles et nos tantes qui n'ont jamais cessé de nous encourager et de nous soutenir dans les moments difficiles.

Je dédie cet humble ouvrage à mon cher frère « Abdelmalek » et mes sœurs : Djihed, Douaa et l'adorable Djoumana, sont la raison de mon sourire et mon bonheur.

A mes chères copines : Nessrine, Amina et Meriem je vous dédie cet humble travail, vous êtes mon bras droit et mon bonheur. (Ilhem)

Je dédie ce travail à mes sœurs : Amina, Maroua, Safa, Bouchra et mon mari « Benmili Amir », sont l'une des raisons de mon succès et de mon bonheur, ils m'ont permis de me réaliser à la hauteur de mes ambitions. (Ibtissem)

**DERBAL Ilhem et BOUZAHZAH Ibtissem**

# Sommaire :

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction page

## la première partie : synthèse bibliographique

<b>I. Le system Reproducteur Male.....</b>	<b>4</b>
1. Généralités sur le système reproducteur.....	4
Le système génital masculin.....	4
2. Anatomie du système génital de l'homme.....	5
Le scrotum .....	5
a.La peau scrotale.....	6
b.Le fascia spermatique externe .....	6
c.Le fascia crémasterique .....	6
d.Le fascia crémasterique interne.....	7
Les testicules .....	7
3. Physiologie du système génital masculin.....	9
3.1. Le sperme.....	9
3.2. La spermatogénèse .....	10
3.3.La Spermiogénèse.....	13
4. La régulation hormonale de la fonction de reproduction chez l'homme.....	14
<b>II. La doxorubicine.....</b>	<b>15</b>
1. Propriétés chimiques et pharmaceutiques de la doxorubicine (DOX).....	15
2.Absorption et distribution de la DOX.....	17
3. Métabolisme et élimination.....	17
4. Mécanismes d'action et toxicité de la DOX.....	20
4.1.Mécanisme lié aux dommages à l'ADN.....	20
4.2. Toxicité de la DOX et stress oxydatif.....	21

4.2.1.La cardiotoxicité.....	21
A. La DOX et production des ROS.....	24
B. Le dysfonctionnement mitochondrial.....	25
DOX et ferroptose .....	25
DOX et apoptose.....	26
4.2.2. L'hépatotoxicité.....	27
4.2. 3. La néphrotoxicité.....	28
4.2. 4. Les effets protecteurs des antioxydants vis a vis la toxicité de la DOX.....	29
4.2.5 Effets toxiques de la DOX sur les testicules.....	31
Induction du stress oxydatif.....	31
La DOX et spermatogenèse.....	34
5. Les défenses antioxydantes vis-à-vis des dommages oxydatifs induits par la DOX.....	34
5.1. Les antioxydants enzymatiques.....	34
5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	34
5.1.2. Les glutathions peroxydaes (GPx).....	35
5.1.3. Catalase (CAT).....	35
5. 2. Les antioxydants non enzymatiques.....	36
5.2.1. Le glutathion réduit (GSH).....	36
5.2.2. La vitamine E ( $\alpha$ -Tocophérol).....	36
5.2.3. La vitamine C (Acide ascorbique).....	37
5.2.4. Les polyphénols.....	37
Les flavonoïdes.....	38
Activités antioxydantes des flavonoïdes.....	39
6. Protection des antioxydant contre les dommages testiculaires induits par la DOX.....	41
<b>III- <i>Crataegus sp</i>.....</b>	<b>48</b>
1. Description botanique de la plante.....	48
2. Noms vernaculaires.....	49
3. Classification taxonomique de l'espèce <i>Crataegus sp</i> .....	50
4. Intérêt biologique de l'espèce <i>Crataegus sp</i> .....	50

5. Effet chimio-protecteur de genre *Crataegus* vis-à-vis de la toxicité testiculaire induite par la DOX.....51

## **Deuxième partie : Partie expérimentale in vitro et in vivo**

<b>I. Matériels et méthodes.....</b>	<b>53</b>
1. Matériel végétal.....	53
2. Préparation de l'extrait de plante.....	53
3. Modèle expérimental <i>in vitro</i> .....	53
3.1 Détermination des polyphénols totaux dans l'extrait.....	53
3.2. Détermination de la teneur totale de l'extrait en flavonoïdes.....	54
3.3. Evaluation du pouvoir antiradicalaire (DPPH).....	54
3.4. Détermination des concentrations inhibitrice médianes « IC <sub>50</sub> ».....	54
3.5 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO).....	55
4. Modèle expérimental <i>in vivo</i> .....	56
4.1. Animaux et conditions d'hébergement.....	56
4.2.Évaluation biochimique et mesure des paramètres de stress oxydatif.....	57
4.2.1. Dosage du MDA au niveau de l'homogénat.....	57
4.2.2. Dosage de glutathion testiculaire.....	57
4.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique du Glutathion peroxydase (GP <sub>X</sub> ).....	57
4.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique du Catalase (CAT).....	58
4.3. Etude histologique.....	59
4.4.Évaluation statistique.....	59
<b>II. Résultats et Discussion.....</b>	<b>60</b>
II.1. Résultats et discussion de la partie expérimentale <i>in vivo</i> .....	60
1. Rendements d'extraction et dosage des polyphénols totaux.....	60
Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux .....	60
2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire.....	60
3. Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	61
4. Effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -butanol vis à vis la peroxydation lipidique.....	62
5. Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol, la vitamine E et la DOX sur le niveau de GSH testiculaire.....	63



6. Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité des enzymes antioxydante testiculaire (GPx et CAT).....	63
7. Étude histologique au niveau des testicules.....	64
II.2. Discussion.....	66
<b>Conclusion.....</b>	<b>72</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>73</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**3b-HSD** : 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

**17b-HSD** : 17 $\beta$  -Hydroxysteroid dehydrogenase

**ADN**: Acide désoxyribonucléique

**AG**: Acide Gras

**ADP**: Adenosine diphosphate

**AMP**: Adenosine monophosphate

**ATP**: Adénosine triphosphate

**Bcl-2**: B- cellule lymphoma 2

**CAT**: catalase

**CL**:Cardiolipine

**CYP450**: Cytochrome P450

**Cyt c**: Cytochrome c

**DOX**:Doxorubicin

**DOXol**: doxorubicinol

**EWAT**:Epididymal white adipose tissue

**FDA**: Food and Drug Administration

**FSH**: Follicle Stimulating Hormone

**G6PD**: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

**GnRH**:Gonadotropin-Releasing Hormone

**GPx**: Glutathione peroxidase

**GR**:Glutathione reductase

**GSH**: Reduced glutathione

**GSSG**: Glutathione disulfide

**GST** : Glutathione S-transferase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène

**IGF-1**: Insulin-Like Growth Factor 1

**IKK- I $\kappa$ B**:kinase

**KLF-4**: Kruppel-like factor 4

**LDH**: Low Density Lipoproteine

**LH**:Luteinizing Hormone

**LPO**: Lipoxigénase

**MAPK**: Mitogen-Activated Protein kinases

**MDA:** Malondialdehyde

**MPT :** Pores de Transition Mitochondriales

**NADH :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**NADPH :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**NF-KB:** Nuclear factor-kappaB

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:**Anion Superoxyde

**OH<sup>•</sup>:** Radical Hydroxyle

**ONOO<sup>-</sup>:**Peroxynitrite

**Ox-PL:** Phospholipides Oxydé

**PH:** Potentiel Hydrogène

**Pi:** Inorganic phosphate

**PL:** phospholipide

**PPAR-c:** peroxisome proliferator-activated receptor gamma

**RL:**Radicaux Libres

**RO<sup>•</sup> :** Radicale aloxyle

**ROO<sup>•</sup> :** Radicale peroxyde

**ROS:**Reactive Oxygen Species

**StAR:**Steroidogenic acute regulatory protein

**SOD:**Superoxyde Dismutase

**TG:** Triglycéride

**Top II:**Topoisomérase II

**VIT:** Vitamin

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Le système reproducteur mâle.....	5
<b>Figure 2:</b> Le scrotum et ses constituants.....	6
<b>Figure 3:</b> Structure du testicule.....	9
<b>Figure 4 :</b> Histologie des tubes séminifère, site de la spermatogénèse.....	11
<b>Figure 5:</b> La spermatogénèse.....	12
<b>Figure 6:</b> Spermiogénèse: Transformation d'une spermatide es spermatozoïde.....	14
<b>Figure 7:</b> Régulation hormonale de la fonction testiculaire par l'axe hypothalamo-hypophysogonadique.....	15
<b>Figure 8:</b> Structure chimique de la DOX et ses principales métabolites.....	17
<b>Figure 9:</b> Principales voies de la biotransformation de la DOX.....	19
<b>Figure 10:</b> Mécanisme d'action moléculaire de la DOX.....	21
<b>Figure 11:</b> Mécanisme moléculaire de la cardiotoxicité induite par la DOX.....	23
<b>Figure 12:</b> Voies d'induction du stress oxydant par la DOX.....	25
<b>Figure 13:</b> Mécanisme de l'oxydation des phospholipides induite par la DOX, à l'origine d'une ferroptose dans les cardiomyocytes.....	26
<b>Figure 14:</b> Induction de la mort cellulaire par la DOX.....	27
<b>Figure 15:</b> La toxicité médiée par la DOX dans le foie.....	28
<b>Figure 16:</b> La néphrotoxicité induite par la DOX.....	29
<b>Figure 17:</b> Stress oxydatif et apoptose induits par la DOX au niveau du tissu testiculaire (Renu et.....	33
<b>Figure 18:</b> Toxicité testiculaire induite par la DOX et le rôle de DA-9401 comme un antioxydant.....	34
<b>Figure 19:</b> Effet de la DOX sur le processus de la spermatogénèse.....	35
<b>Figure 20:</b> Rôle des différents types de SOD dans la dismutation de l'anion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .).....	36
<b>Figure 21:</b> Les enzymes antioxydantes qui interviennent dans la désintoxication des ROS.....	37
<b>Figure 22:</b> Structures chimiques représentatives des principaux groupes de polyphénols..	39

<b>Figure 23:</b> Structure de base des flavonoïdes.....	40
<b>Figure 24:</b> Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes.....	41
<b>Figure 25:</b> Exemple de chélation de fer par les flavonoïdes.....	41
<b>Figure 26:</b> Différentes espèces du genre Crataegus.....	50
<b>Figure 27:</b> Les différents effets des composés majeurs du genre Crataegus.....	52
<b>Figure 28:</b> Principe de dosage du Malondialdéhyde.....	56
<b>Figure 29:</b> Pourcentage de l'activité antiradicalaire de l'extrait n-butanol de Crataegus spvis-à-vis du radical libre DPPH.....	62
<b>Figure 30 :</b> Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait n-butanol de Crataegus sp et la vitamine C.....	63
<b>Figure 31:</b> Effet de l'extrait n-butanol, la vitamine E et la DOX sur la production du MDA dans Les cellules testiculaires.....	63
<b>Figure 32:</b> Effet de l'extrait n-butanol, la vitamine E et la DOX sur la variation de glutathion (GSH) dans Les cellules testiculaires.....	64
<b>Figure 33:</b> Effet de l'extrait n-butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la glutathion peroxidase (GPx) dans les cellules des testicules..	65
<b>Figure 34:</b> Effet de l'extrait n-butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la Catalase dans les cellules des testicules.....	65

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Les défenses antioxydantes vis-à-vis des dommages oxydatifs induits par la DOX au niveau du cœur, du foie et des reins .....	30
<b>Tableau 2:</b> L'activité de quelques antioxydants vis-à-vis des dommages testiculaires induits par la DOX.....	43
<b>Tableau 3:</b> Rendement des extraits .....	61
<b>Tableau 4:</b> Effet protecteur de l'extrait n-buyanol de crataegus sp et de la Vit E vis-à-vis les changements histopathologiques des testicules des rats induits par la DOX.....	66

### **Introduction :**

La toxicologie médicamenteuse est devenue un sujet d'actualité qui constitue un axe de recherche très important. Elle est considérée comme une source majeure de problèmes de santé publique et une cause principale de mortalité dans le monde (Salam et Allam, 2015).

La doxorubicine (DOX) est l'un des médicaments antinéoplasiques les plus répandus dans le monde entier. Il est connu pour ses vertus pharmacologiques importantes et il est utilisé en oncologie clinique pour le traitement de différents types de cancers tels que les carcinomes du sein et de l'œsophage, les leucémies, les tumeurs solides et les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens. Malgré sa valeur thérapeutique, son utilisation est limitée en raison de leurs effets indésirables toxiques sur différents organes, notamment le système reproducteur (Lauzon, 2008; Granados-Principal *et al.*, 2010; Ola-Davies *et al.*, 2015; Nowrouzi *et al.*, 2019).

Les testicules sont l'unité morphologique et fonctionnelle de la reproduction, formant ainsi la principale glande génitale masculine qui assure deux fonctions fondamentales; une fonction endocrine caractérisée par la sécrétion d'hormones sexuelles, et une fonction exocrine par la production des spermatozoïdes (Marieb et Hoehn, 2010; Kamina, 2013; Noblanc, 2013).

Le mécanisme exact de la toxicité de la DOX au niveau des testicules n'a pas encore été élucidé, mais plusieurs études ont montré que le principal mécanisme pathogène semble être la génération des radicaux libres toxiques et l'induction du stress oxydatif (Renu et Valsala, 2019).

La phytothérapie constitue un des fondements de la médecine traditionnelle pratiquée à travers le monde, elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies (Dutertre, 2011). Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la phytothérapie n'a jamais cessé d'évoluer. Les plantes médicinales contiennent un grand nombre de molécules actives d'intérêt biologique mis à profit dans l'industrie, l'alimentation, la cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces molécules, on trouve les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes. Les flavonoïdes possèdent potentiellement des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes et antimicrobiennes (Baharun, 1997; Atik bekkara *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont été intéressées par l'analyse de l'effet protecteur de différentes plantes médicinales vis-à-vis de la toxicité induite par la DOX au niveau de différents organes. Dans ce

cadre, de nombreuses plantes ont été testées en tant qu'antioxydants (Mecheri *et al.*, 2018 ; 2019).

Notre étude vise à évaluer l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp vis-à-vis de la toxicité testiculaire induite par la DOX chez les rats *Wistar albinos*. Dans ce contexte, deux études ont été effectuées parallèlement :

Une première étude *in vitro* afin d'évaluer le pouvoir antioxydant (piégeage de radical DPPH et inhibition de la peroxydation lipidique) et le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp.

Une deuxième étude expérimentale *in vivo* qui vise à évaluer l'activité protectrice des antioxydants présents dans l'extrait butanolique de *Crataegus* sp contre la toxicité testiculaire provoquée par la DOX.



**Première Partie :**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Le system reproducteur mâle :**

### **1. Généralités sur le système reproducteur :**

Le fonctionnement de la plupart des systèmes de l'organisme doit être assuré d'une manière continue pour garder l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie. La seule exception est le système génital, qui semble « dormir » jusqu'à la puberté (Marieb et Hoehn, 2010), il ne contribue pas à l'homéostasie, mais il exerce d'autres effets importants (Sherwood, 2008).

Le système de reproduction joue un rôle vital en assurant la continuité de l'espèce, c'est une collection d'organes génitaux internes et externes chez les hommes et les femmes-impliqués dans le processus de reproduction, qui travaillent en collaboration dans le but de procréer et produire une progéniture.

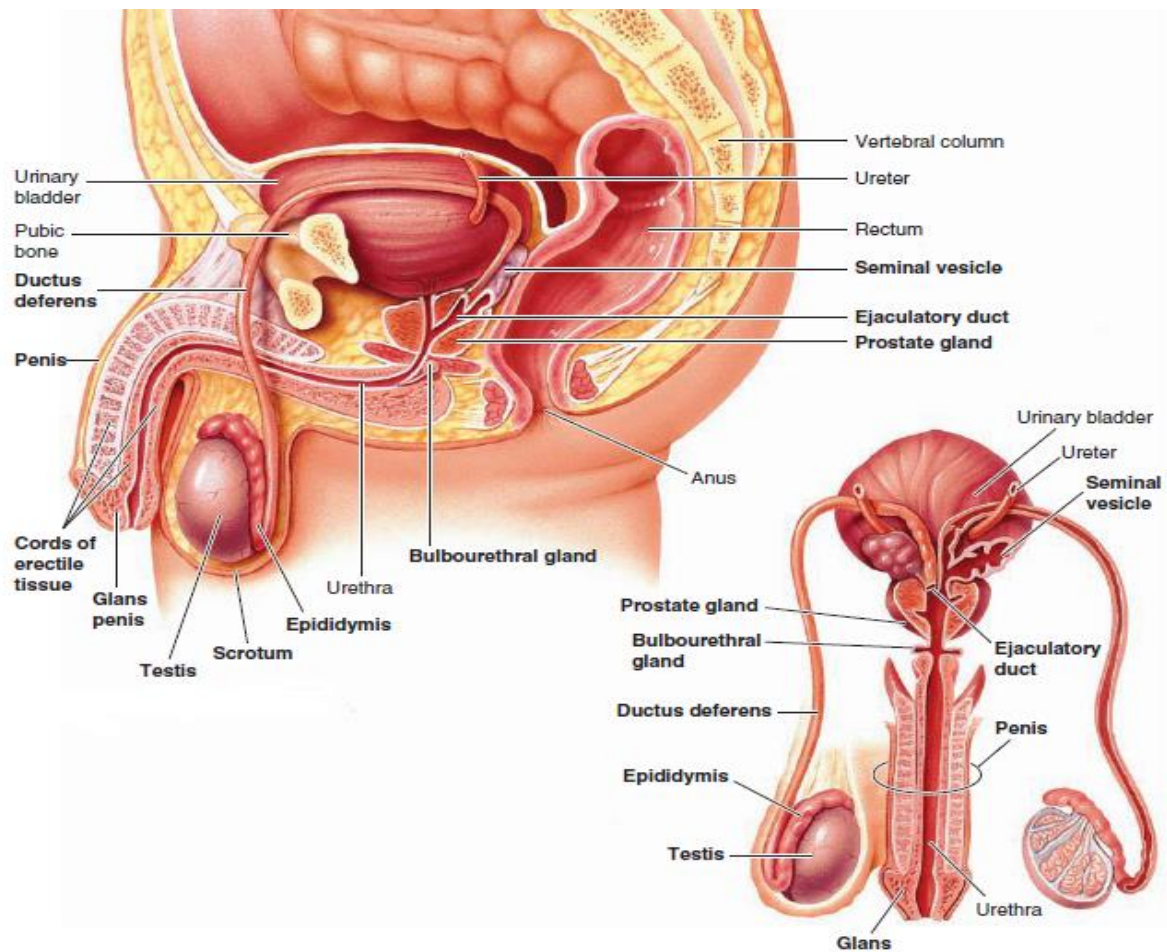
Le système génital est nécessaire à la production de nouveaux organismes vivants qui est une caractéristique fondamentale de la vie. Le système reproducteur comprend les gonades, organes sexuels primaires, sont les testicules chez les mâles et les ovaires chez les femelles, et les organes reproducteurs accessoires (Phillip, 2001). Ces gonades produisent des cellules sexuelles, ou gamètes, mais sécrètent également des hormones stéroïdes, généralement appelées hormones sexuelles et sont considérés comme des glandes endocrines. Une nouvelle vie commence lorsqu'un ovule d'une femme est fécondé par le sperme d'un homme. Les ovules sont fabriqués dans les ovaires et les spermatozoïdes dans les testicules (Marieb et Hoehn, 2010).

#### **• Le système génital masculin :**

Le système génital masculin est un système complexe et spécifique puisqu'il remplit deux fonctions : D'abord, il participe à la création de nouveaux individus possédant un bagage génétique provenant d'un mélange des gènes des parents. Ensuite, ce système joue un rôle important dans la phase de la puberté en aidant à maintenir l'équilibre physiologique chez l'homme.

La fonction génitale de l'homme est d'élaborer les gamètes mâles, appelés les spermatozoïdes, et de les introduire dans les voies génitales de la femme, où la fécondation est possible. Les organes du tractus génital masculins sont divisés en deux groupes : des organes génitaux internes, qui ont une origine embryologique, non visibles, destinés essentiellement à la reproduction à savoir les testicules, les épидидymes, les conduits spermatiques (déférents et

éjaculateurs), la prostate, les glandes séminales et les glandes bulbo-urétrales ; et des organes génitaux externes, visibles, destinés surtout à la copulation, et comprennent le pénis et le scrotum (Kamina, 2013) (Fig.1).



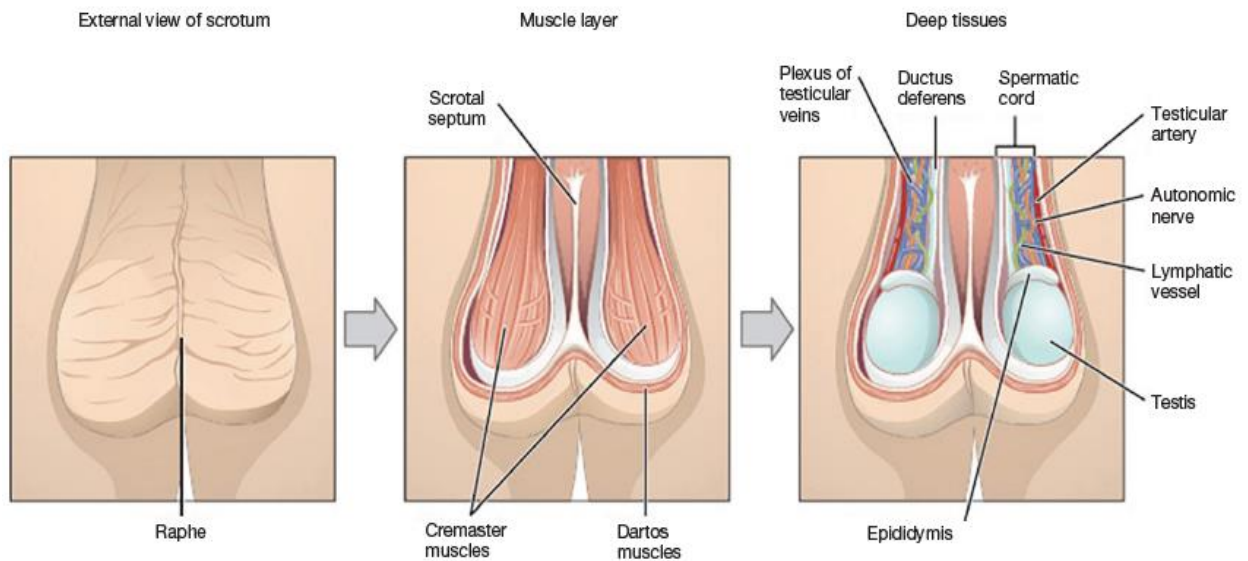
**Figure 1:** Le système reproducteur mâle (Sherwood , 2008)

## **2. Anatomie du système génital de l'homme :**

- **Le scrotum :**

Le scrotum est un sac externe pigmenté de peau et de fascia superficiel, c'est une poche protectrice qui constitue l'enveloppe cutanée des testicules , les deux glandes sexuelles masculines qui produisent de la testostérone et qui sont le siège de la spermatogénèse(Noblanç, 2013) .Suspendu à l'extérieur des cavités abdominales et pelviennes au niveau de la racine du pénis (Marieb et Hoehn, 2010), cette localisation permet de protéger et de faciliter physiquement la régulation de la température des testicules et rester à une température légèrement inférieure à celle du corps, ce qui est une condition indispensable pour assurer une spermatogénèse optimale (Phillip, 2001).Il est bien alimenté par le sang (il contient les artères et les veines) et il présente

des poils clairsemés, une cloison médiane divise le scrotum en deux loges testiculaires par le septum scrotal (Fig.2).



**Figure 2:** Le scrotum et ses constituants (Patel, 2017)

La peau du scrotum est d'une nature spécifique présentant plusieurs caractéristiques d'une muqueuse transformée lors de l'embryogénèse, elle pourrait jouer un rôle dans le dispositif hormonal. Le scrotum est en fait la première enveloppe d'un organe multicouche protégeant le testicule. De la couche superficielle à la profondeur, le scrotum comprend :

**a. La peau scrotale :**

Elle est fine et extensible avec un épithélium pigmenté, son derme ou tunique *dartos* est riche en fibres musculaires lisses ou muscle *dartos* qui joue un rôle thermorégulateur : sa contraction, en réduisant la surface du scrotum, diminue la température intra-scrotale. Il forme au niveau du plan médian le septum scrotal. (Kamina, 2013)

**b. Le fascia spermatique externe :**

Il se continue avec le fascia superficiel du pénis (Kamina, 2013)

**c. Le fascia crémasterique :**

Ce tissu aléatoire contient l'épanouissement terminal des faisceaux du muscle crémaster (Kamina, 2013). Ce muscle formé de bandes de tissu musculaire squelettique qui prennent naissance dans le muscle oblique interne de l'abdomen, permet l'ascension des testicules.

### d. Le fascia crémastérique interne :

Il se continue avec le fascia profond du pénis (Kamina, 2013)

#### ● Les testicules :

Les testicules dérivent de la tête gonadique embryonnaire située à l'arrière de la cavité abdominale. Dans les derniers mois de la vie fœtale, ils sortent de cette cavité par le canal inguinal pour terminer dans le scrotum (Sherwood, 2006).

Sont la principale glande génitale masculine qui assure deux fonctions fondamentales ; une fonction endocrine caractérisée par la sécrétion d'hormones sexuelles, et une fonction exocrine par la production des spermatozoïdes (Noblanc, 2013).

Les testicules sont intimement unis avec l'épididyme, formant ainsi l'unité morphologique et fonctionnelle de la reproduction (Kamina, 2013). Ils sont de forme ovoïde, paire d'organes ovales légèrement aplatis qui mesurent environ 4 cm de longueur et 2,5 cm de large chez l'homme (Marieb et Hoehn, 2010). Ils sont recouverts de deux tuniques. La tunique vaginale, membrane séreuse qui recouvre le testicule à l'exception d'une zone de la face médiale (Heffner, 2001) (Fig.3a). La cavité de la tunique vaginale présente un cul-de-sac entre le corps de l'épididyme et le testicule formant le sinus épидидymaire (Kamina, 2013). La tunique située plus en profondeur est l'albuginée ou tunique albuginée (*albus* : blanc), collée à la séreuse, formant un sac fibreux (riche en fibres de collagènes, fibres élastiques) appelé la capsule fibreuse du testicule (Marieb et Hoehn, 2010)

Des expansions de l'albuginée cloisonnent le testicule en compartiments appelés lobules, chaque testicule est composé de 200 à 300 lobules chez l'homme, dans lesquels on trouve outre des vaisseaux sanguins, les tubes séminifères et le tissu interstitiel entre les tubes séminifères (Marieb et Hoehn, 2010). Ces expansions convergent en profondeur formant le *mediastinum testis* (ou corps de Highmore) ; un tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux et contient le *retetestis* (réseau de Haller), un réseau de tubules du médiastin testiculaire qui transportent les spermatozoïdes des tubules séminifères jusqu'aux canaux efférents. Chaque lobule renferme de un à quatre tubules séminifères contournés et emmêlés qui fabriquent les spermatozoïdes et qui fusionnent pour former un tubule séminifère droit (Ilacqua *et al.*, 2017). Chaque tubule séminifère est entouré de 3 à 5 couches de cellules myoïdes qui aident à compresser les spermatozoïdes et le liquide testiculaire dans les tubules et à les extraire des testicules par leurs contractions rythmiques (Marieb et Hoehn, 2010) (Fig.3c). Le tubule séminifère droit vers lequel les tubules séminifères de chaque lobule convergent, se raccorde au *retetestis* qui constitue,

avec lui, les premières voies de l'excrétion du sperme. Les spermatozoïdes quittent le testicule par les canalicules efférents et pénètrent dans l'épididyme, les spermatozoïdes immatures passent par la tête, le corps et la queue de l'épididyme où ils sont emmagasinés jusqu'à l'éjaculation (Marieb et Hoehn , 2010).

Le tissu conjonctif qui recouvre les tubes séminifères contournés, renferme les cellules de Sertoli qui constituent avec les cellules germinales un épithélium uni stratifié qui tapissent la paroi des tubes séminifères. Les cellules de sertoli ont une fonction nutritive pour les futurs spermatozoïdes et forment la barrière hémato-testiculaire. La méiose qui est le processus à l'origine de la production des gamètes mâles, a lieu au niveau des parois de ces cellules de soutien. Le tissu conjonctif renferme également des cellules interstitielles, aussi appelées cellules de Leydig. Ces cellules sont groupées en amas dans l'espace interstitiel, qui sépare les tubes séminifères (Noblanc, 2013; Tremblay, 2018). Elles synthétisent essentiellement les hormones androgènes (en particulier la testostérone) et les libèrent dans le liquide interstitiel où elle baigne (Marieb et Hoehn , 2010), et produisent également d'autres molécules :de l'ocytocine et de la vasopressine (ADH) pour contracter les cellules myoïdes des tubes séminifères ; de l'IGF-1, sécrété également par les cellules de sertoli, qui augmente le nombre des récepteurs à la LH et active des enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse ; des œstrogènes, estrone (E1) et estriol (E3).

Le testicule présente une vascularisation et une innervation particulière, sont irrigués par les artères testiculaires (Noblanc, 2013). Les veines testiculaires constituent un réseau appelé plexus pampiniforme qui a une activité musculaire nécessaire aidant à maintenir la température un peu plus basse convenant à la physiologie normale des testicules (Marieb *et al.*, 2007).

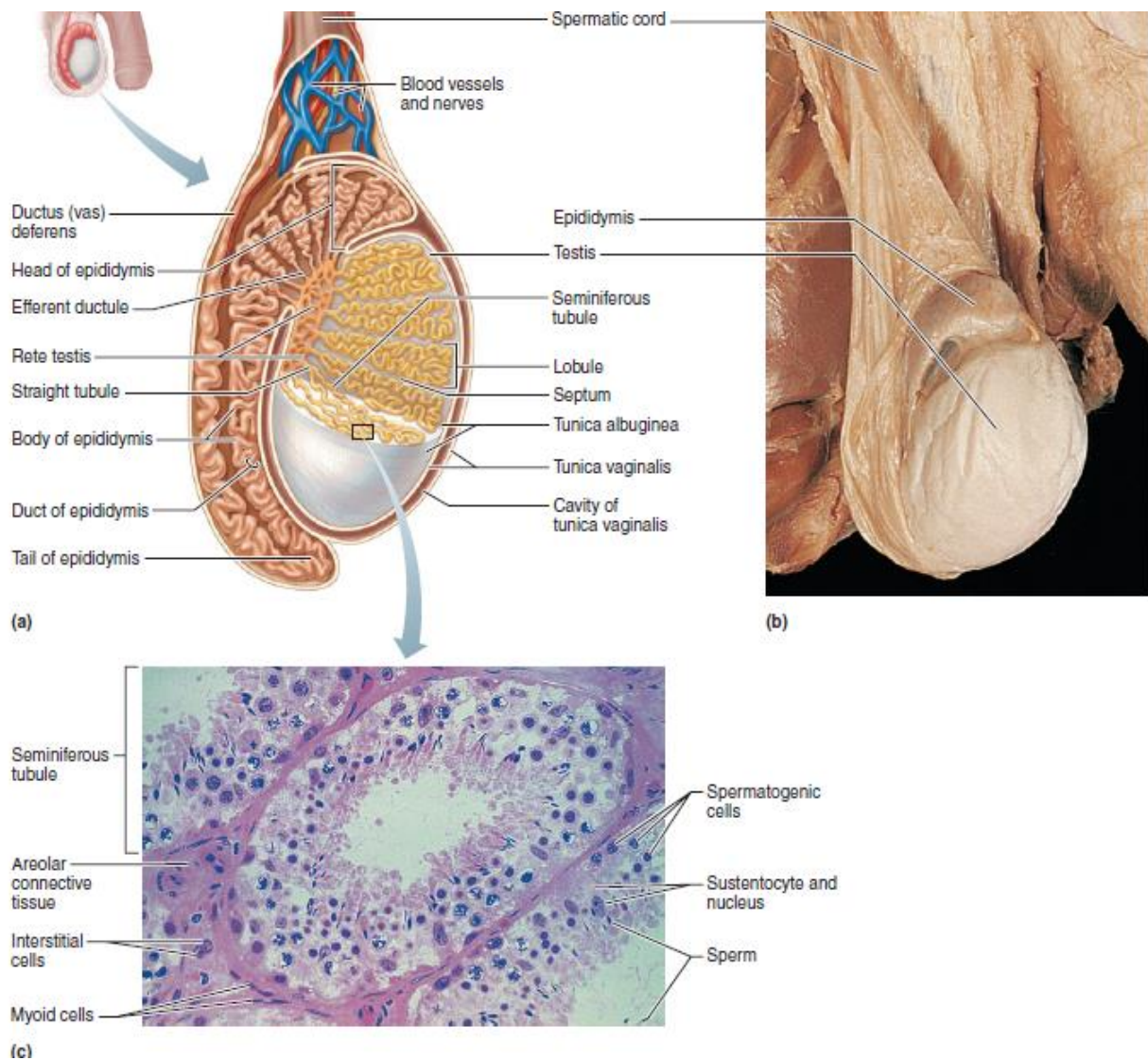


Figure 3: Structure du testicule (Marieb *et al.*, 2007)

### 3. Physiologie du système génital masculin :

Le testicule assure principalement deux fonctions principales, endocrines et exocrines. La fonction endocrine consiste à élaborer et sécréter les hormones sexuelles, les androgènes et l'inhibine (et l'hormone antimüllérienne chez l'embryon). La fonction exocrine comprend la spermatogénèse (Kamina, 2013)

#### 3.1. Le sperme :

Le sperme, ou liquide séminal, est le liquide blanchâtre légèrement collant qui renferme les spermatozoïdes, le liquide testiculaire et les sécrétions des glandes annexes lors de l'éjaculation. Ce liquide constitue le milieu de transport des spermatozoïdes, il contient des nutriments ainsi que des substances chimiques qui protègent et facilitent leurs mouvements en

raison de la disponibilité de certaines enzymes et d'une hormone importante, appelée « relaxine » (Sherwood, 2008; Marieb et Hoehn, 2010). Le sperme contient également des prostaglandines qui proviennent des vésicules séminales, ce sont les messagers chimiques les plus ubiquitaires dans l'organisme. Ils réduisent la viscosité du mucus et facilitent la progression des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femme (Sherwood, 2008).

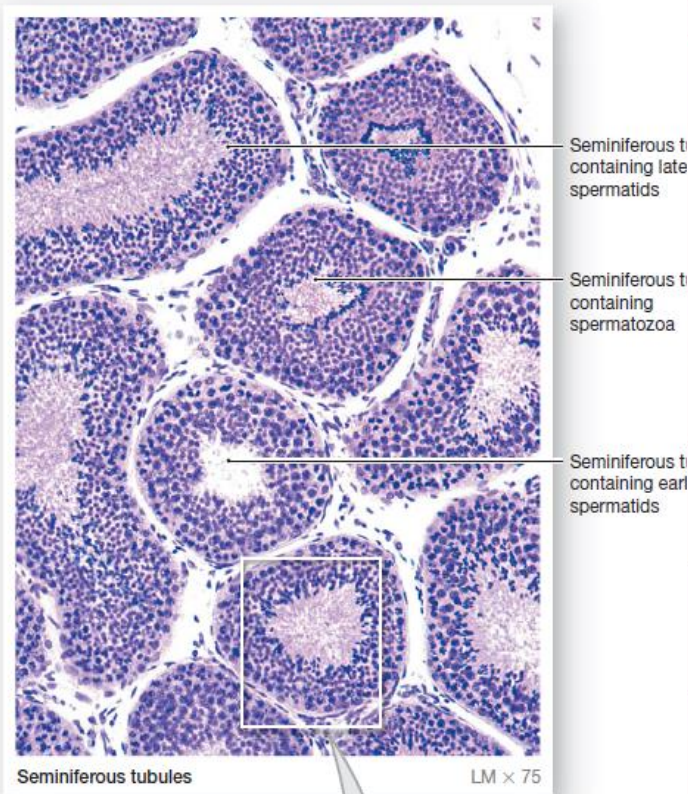
Le sperme renferme en outre des substances qui inactivent la réponse immunitaire des voies génitales de la femme, une substance chimique antibiotique qui réduit certaines bactéries et des facteurs de coagulation qui provoquent sa coagulation peu après l'éjaculation (Marieb et Hoehn, 2010).

### **3.2. La spermatogénèse :**

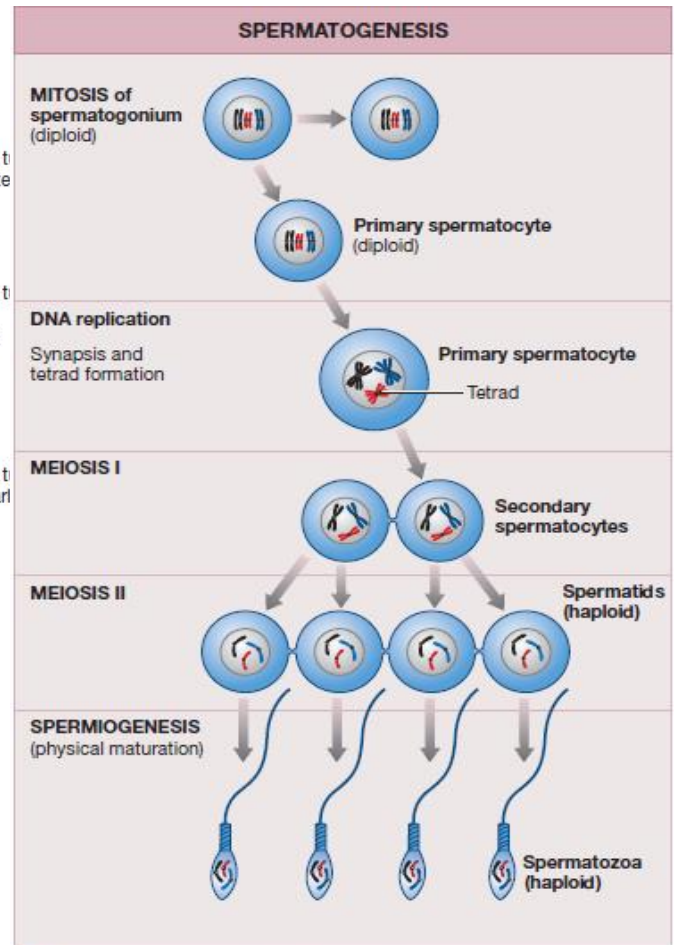
La spermatogénèse (« génération des spermatozoïdes »), c'est une série d'événements qui commence à la puberté, elle se déroule dans les tubes séminifères contournés aboutissant à la production des gamètes mâles (spermatozoïdes) (Fig.4) (Noblanc, 2013; Tremblay, 2018).

Les cellules les plus externes et les plus proches à la membrane basale de l'épithélium, sont les cellules souches appelées « spermatogonies » qui produisent les spermatozoïdes (Phillip, 2001). Au moment de la puberté, la spermatogénèse commence, les spermatogonies subissent des divisions cellulaires. Chaque spermatogonie se divise par mitose pour former deux cellules filles différentes de type A et de type B. La spermatogonie A restera en place, près de la membrane basale dans le but de perpétuer la lignée des cellules germinales, tandis que la spermatogonie B (qui contient 46 chromosomes, cellule diploïde) sera poussée vers la lumière du tubule, où elle se différencie, se spécialise et se transforme en spermatocyte de premier ordre (cellule encore épuisée avec 46 chromosomes) (Sanders et Scanlon, 2007; Marieb *et al.*, 2007). Chaque spermatocyte primaire, produit au cours de la première phase subit la méiose. Lors de la division méiotique (méiose I), chaque spermatocyte primaire se divise en deux spermatocytes secondaires (23 chromosomes, cellules haploïdes) (Fig.5). Ces spermatocytes secondaires subissent rapidement la méiose II, produisant au total quatre spermatides, qui prennent la forme de petites cellules rondes au gros noyau sphérique se trouvant près de la lumière des tubules (Phillip, 2001).

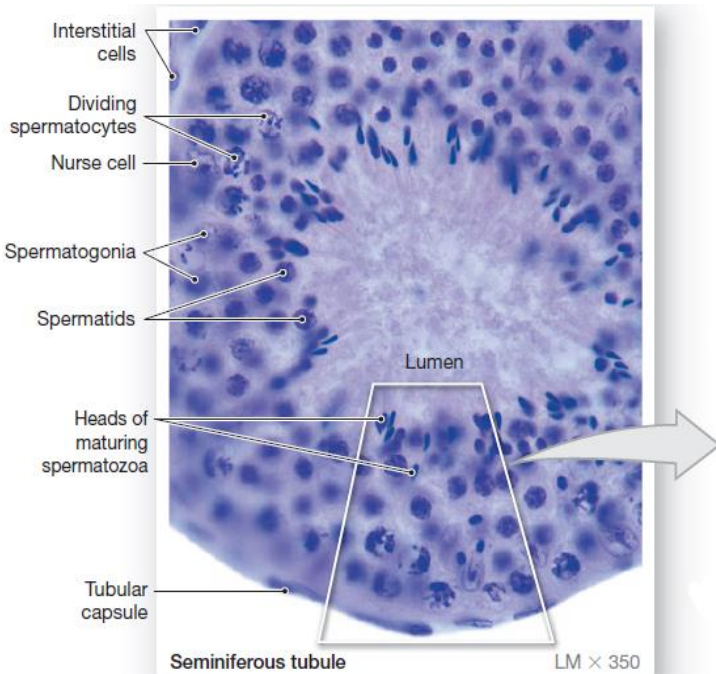




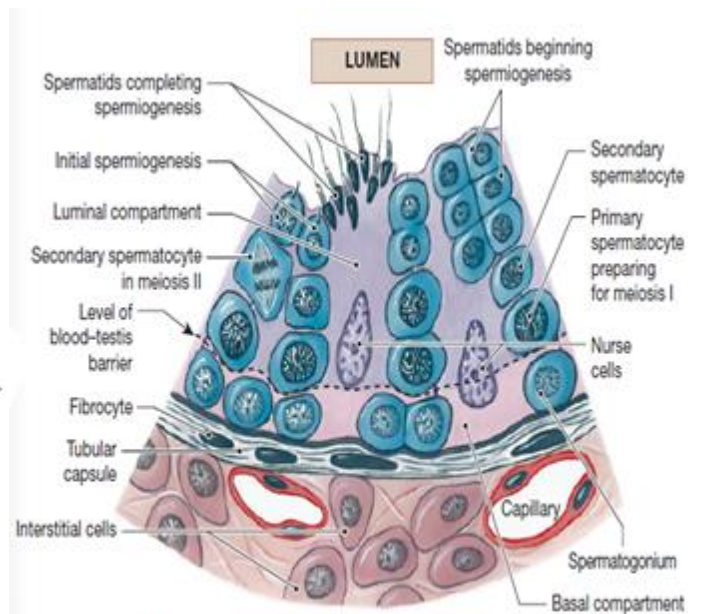
**a** Seminiferous tubules in sectional view



**b** Meiosis in the testes showing the fates of three representative chromosomes

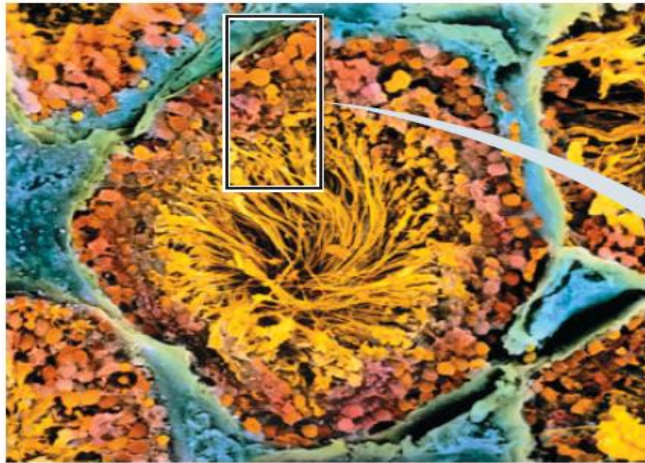


**c** Spermatogenesis within one segment of a seminiferous tubule



**d** The blood-testis barrier and the structure of the wall of a seminiferous tubule

**Figure 4 :** Histologie des tubes séminifère, site de la spermatogénèse (Martini *et al.*, 2012)



(a) Scanning electron micrograph of a cross-sectional view of a seminiferous tubule (200×)

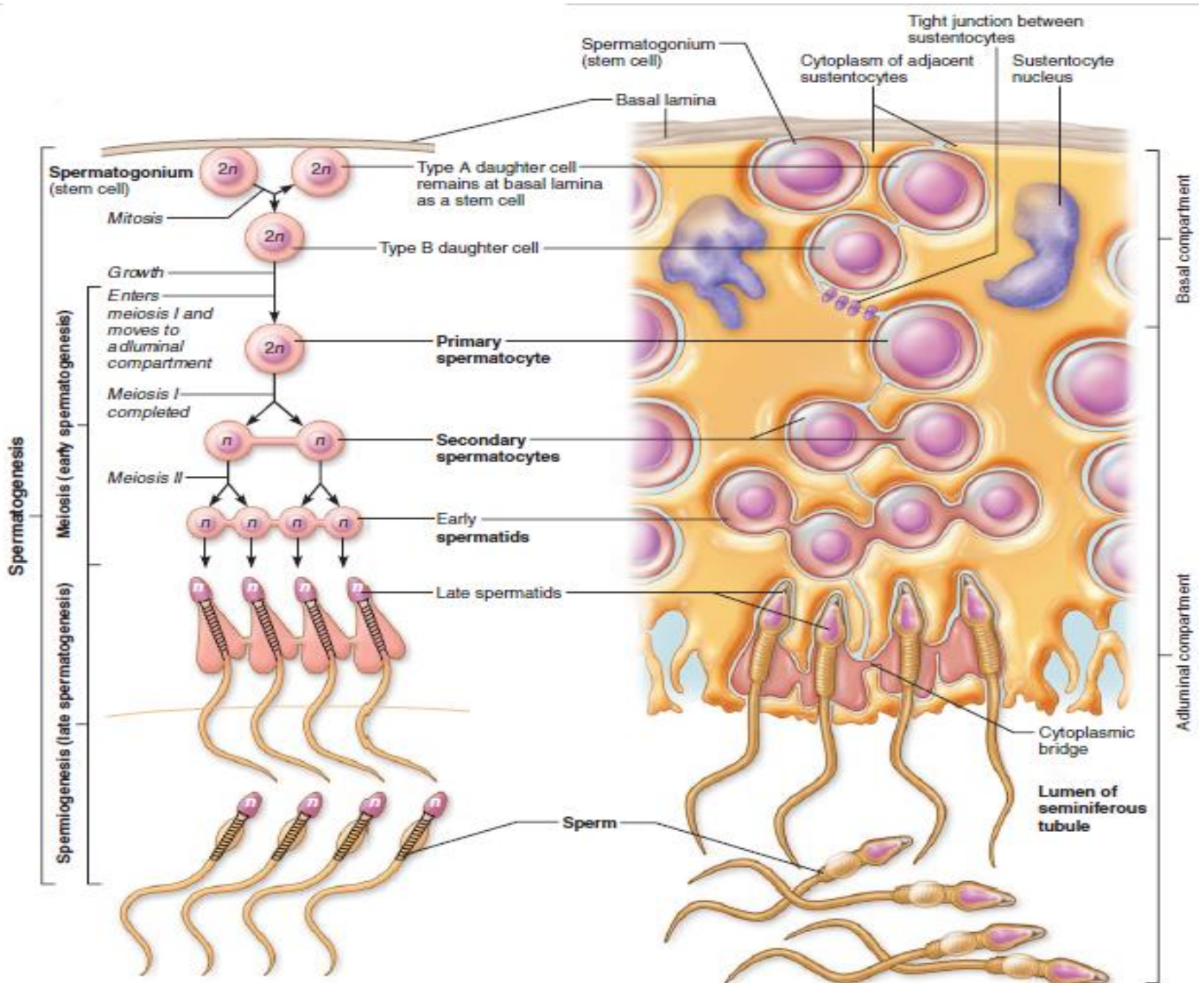


Figure 5: La spermatogénèse (Marieb *et al.*, 2007)

### 3.3. La Spermiogénèse :

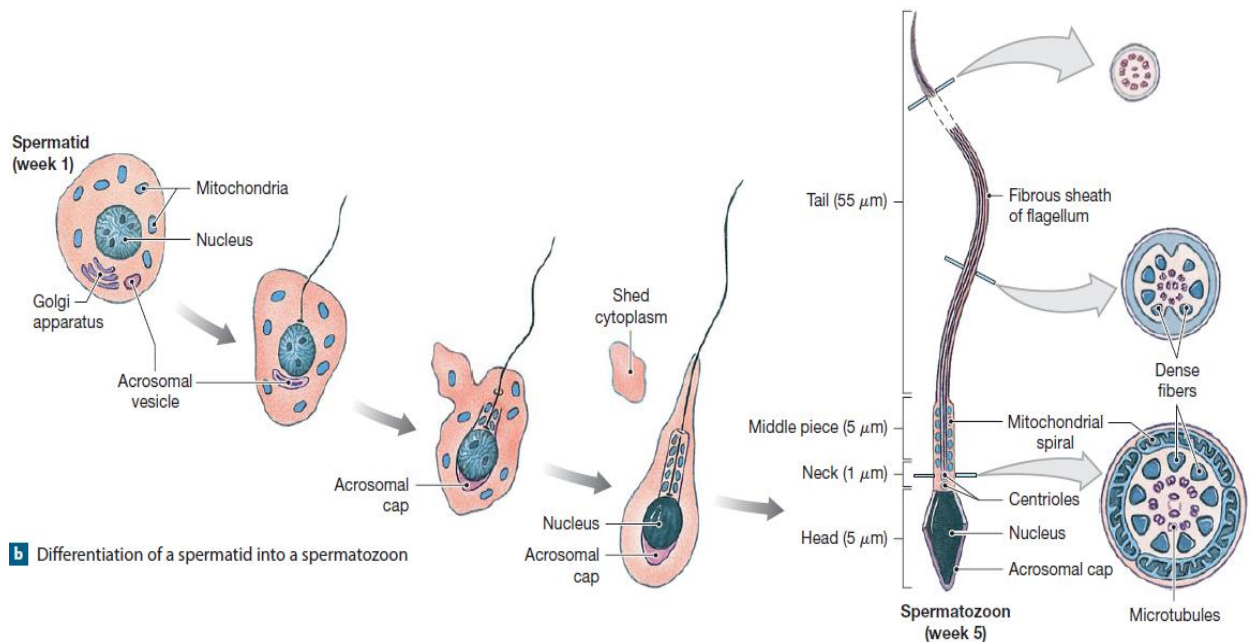
Les spermatides résultant du processus de la spermatogénèse, possèdent un nombre de chromosome adéquat pour la fécondation, mais ne sont pas mobile. Elles doivent encore subir un processus de « profilage » appelé Spermiogénèse, qui lui fera perdre son cytoplasme superflu et la dotera d'une queue. Il s'agit de plusieurs étapes, commençant par l'emballage des enzymes acrosomiales par le complexe golgien, puis la formation de l'acrosome à l'extrémité antérieure du noyau. Ceci abouti à l'élaboration des microtubules, qui formeront le flagelle. Les mitochondries qui se placent autour de la partie proximale du flagelle se multiplient et le cytoplasme superflu s'évacue. Une structure d'un spermatozoïde immature vient d'être libérée d'un épithéliocyte de soutien, et finalement on aura la structure d'un spermatozoïde mature (Fig.6).

A la fin de ce processus, chaque spermatozoïde (« semence animal ») porte les structures suivantes :

- La tête : composé presque entièrement de son noyau aplati et haploïde avec 23 chromosomes, qui contient de l'ADN compact. Le noyau est coiffé de l'acrosome, une structure adhésive, semblable au lysosome et provient des vésicules du corps de Golgi. L'acrosome contient des enzymes hydrolytiques qui permettront au spermatozoïde de pénétrer dans l'ovule (Phillip, 2001).

- La pièce intermédiaire : c'est la première partie de la queue, contient des mitochondries enroulés en formant entre 11 et 13 tours de spires serrées autour des microtubules de la queue. Ces mitochondries produisent de l'énergie métabolique (ATP), utilisée pour générer les mouvements en forme de fouet de la queue qui propulseront les spermatozoïdes dans les voies génitales de la femme (Phillip, 2001).

- La queue : c'est un flagelle typique fabriqué par un centriole ; elle contient un réseau de filaments intermédiaires d'un type particulier qui contribuent au mouvement des spermatozoïdes (Phillip, 2001)



**Figure 6:** Spermiogénèse: Transformation d'une spermatide es spermatozoïde (Martini *et al.*, 2012).

#### 4. La régulation hormonale de la fonction de reproduction chez l'homme :

La régulation hormonale de la production des gamètes et d'hormones sexuelles fait intervenir des interactions entre l'hypothalamus, l'adénohypophyse et les testicules. Ce qui constitue ce qu'on appelle l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique, qui est régulé par une série d'événements successifs (Fig.7).

La production des spermés est régulée par les hormones :

L'hypothalamus commence à sécréter la gonadolibérine (Gn-RH) à la puberté, qui sera transportée jusqu'à l'adénohypophyse par la circulation sanguine du système porte hypophysaire (Marieb et Hoehn , 2010).

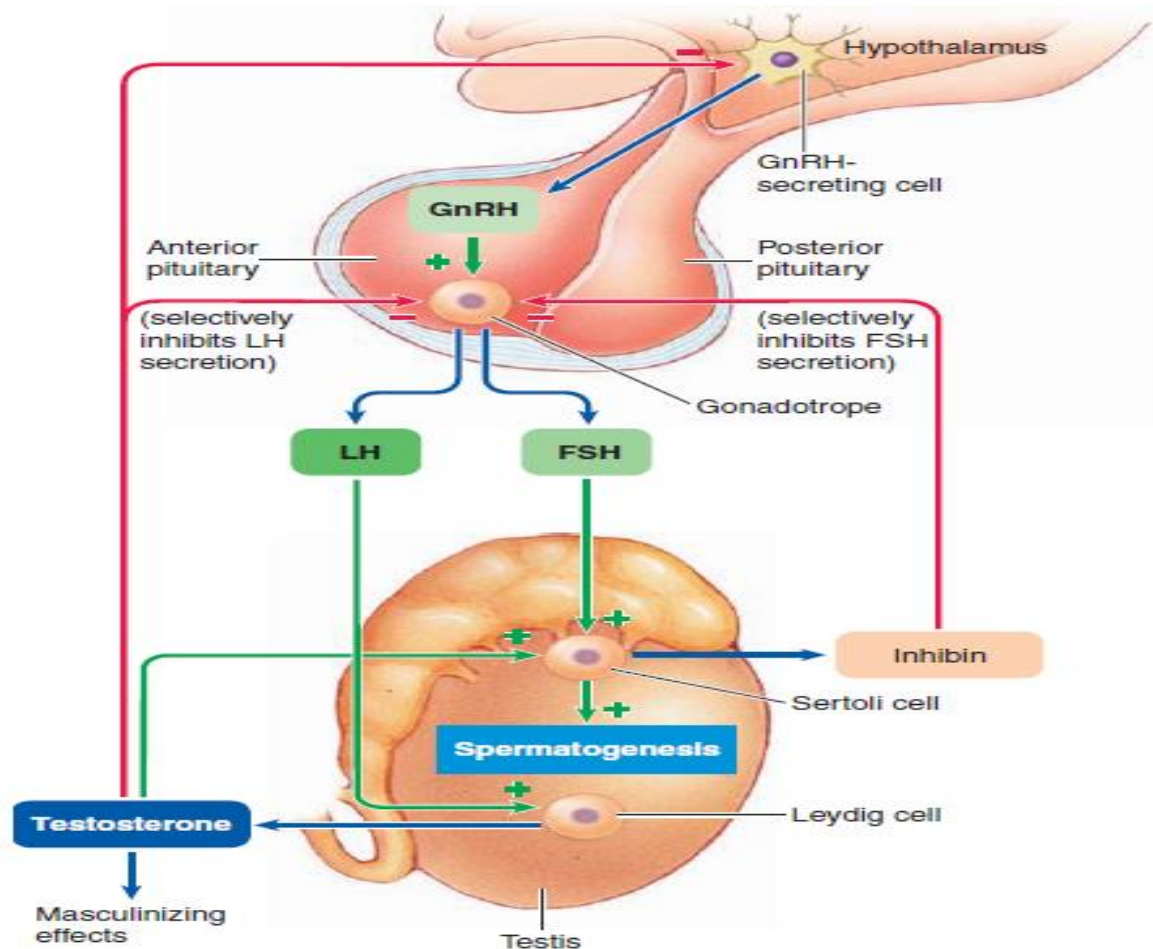
La Gn-RH stimule l'hypophyse antérieure à sécréter les deux gonadotrophines – l'hormone folliculostimulante FSH et l'hormone lutéinisante LH- qui seront libérés dans le sang après la liaison de la Gn-RH aux cellules hypophysaires. La FSH stimule indirectement la spermatogénèse en déclenchant la sécrétion d'ABP par les épithéliocytes de soutien (Phillip, 2001). L'ABP, protéine de liaison aux androgènes, qui les lie (principalement la testostérone) dans les liquides contenus dans les tubules séminifères, elle permet le maintien d'une concentration élevée de la testostérone près des cellules germinales (Martini *et al.*, 2012).

La LH se lie aux cellules interstitielles du tissu conjonctif lâche qui entoure les tubules séminifères contournés favorisant ainsi la sécrétion et donc l'augmentation de la concentration de la testostérone déclenchant la spermatogénèse (Marieb et Hoehn , 2010)

La testostérone entre dans la circulation sanguine et stimule la maturation des organes sexuels et le maintien des caractères sexuels. Le principal effet négatif de la testostérone est le déclenchement d'une boucle de rétro-inhibition en diminuant la libération de GnRH en agissant

sur l'hypothalamus, ce qui diminue d'une manière sélective la libération de LH et de FSH (Sherwood, 2008).

Le signal inhibiteur testiculaire spécifiquement destiné à contrôler la sécrétion de FSH est l'inhibine, hormone peptidique, qui est sécrétée par les cellules de Sertoli. L'inhibine agit directement sur l'hypophyse antérieure pour inhiber sélectivement la sécrétion de FSH et de GnRH (Martini *et al.*, 2012).



**Figure 7:**Régulation hormonale de la fonction testiculaire par l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (Sherwood, 2008)

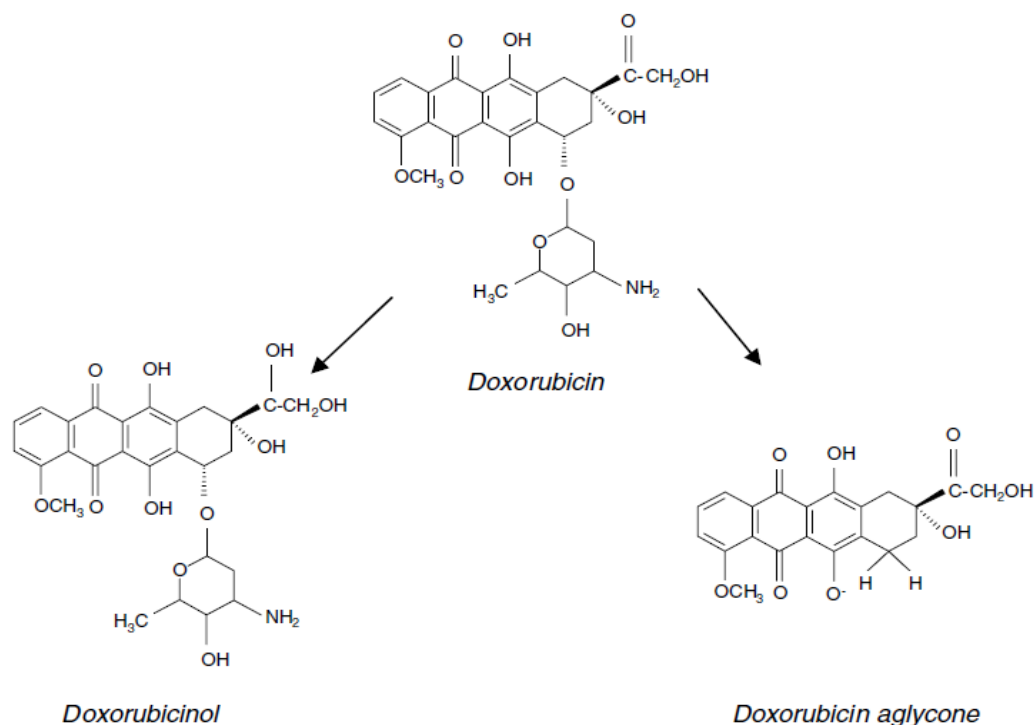
## II. La doxorubicine :

### 1. Propriétés chimiques et pharmaceutiques de la doxorubicine (DOX) :

La DOX, aussi connue sous le nom d'adriamycine (ADR) ou encore 14-hydroxydaunorubicine, appartient à la famille des anthracyclines (Hacker-kлом *et al.*, 1986; Kang *et al.*, 2002; Farsani *et al.*, 2018). Elle est considérée parmi les composés de chimiothérapie les plus efficaces. Actuellement c'est le médicament anticancéreux de première intention contre les tumeurs solides et différents types de cancer (Sah *et al.*, 2015).

Chimiquement consiste en une aglycone tétracyclique, insoluble dans l'eau, appelée adriamicynone (ou 14-hydroxydaunomycine), avec des groupements fonctionnels qui y sont rattachés sont: la quinone-hydroquinone, un substituant méthoxy et une chaîne courte avec un groupement carbonyle se terminant par un alcool primaire (Fig.8). Cette aglycone est liée par une liaison glycosique à une fraction sucre, la daunosamine ou 3-amino-2.3.6-trideoxy-L-fucosyl, responsable de l'hydrosolubilité de la DOX (Carvalho *et al.*, 2009; Tremblay, 2018).

Au cours des années 50, une entreprise italienne, Farmitalia Research Laboratories et une équipe française de recherche du laboratoire Rhône, commencent à investir dans la recherche de composés anticancéreux issus de bactéries et ce n'est qu'en 1960 que la DOX est isolée à partir d'une souche nommée *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (Mobaraki *et al.*, 2017; Mohajeri et Sahebkar, 2018). Bien qu'une synthèse chimique soit possible actuellement (Wallace, 2003; Granados-Principal *et al.*, 2010). Depuis, c'est le meilleur antinéoplasique ayant le spectre d'activité le plus large (Kopalli *et al.*, 2016), très utilisé en oncologie clinique, et à ce titre est inscrit sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS (Lauzon, 2008). Le professeur A. Di Marco est le premier à mettre en évidence des propriétés anticancéreuses de la DOX sur différentes tumeurs expérimentales (Mazevet, 2016). La DOX est introduite en clinique et approuvée par la Food and Drug administration en 1974 (Lauzon, 2008). Malgré sa valeur thérapeutique, son utilisation est limitée en raison de diverses toxicités (Tokarska-Schlattner *et al.*, 2005; Saalu *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013; Renu et Valsala, 2019).



**Figure 8:** Structure chimique de la DOX et ses principales métabolites(Václavíková *et al.*, 2008)

## 2. Absorption et distribution de la DOX :

La DOX est une base faible de 543.52 daltons, qui possède trois PKa. Elle est donc chargée positivement à pH sanguin et ionisée à pH acide et neutre, ce qui lui confère une liposolubilité limitée. La DOX est instable en milieu acide, expliquant l'absence de son administration par voie orale (Chavalle, 2017). Son caractère lipophile lui rend incapable de franchir la barrière hématoencéphalique (Tacar *et al.*, 2013). La DOX présente également des propriétés caustiques interdisant son administration par voie sous cutanée ou intramusculaire (Tremblay, 2018). Donc son administration se fait principalement par voie intraveineuse (afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée) (Lauzon, 2008), sous forme d'une perfusion de 40 à 75 mg/m<sup>2</sup> répétée à des intervalles de 3 à 4 semaines (Wallace, 2003). Parfois la DOX est administrée par voie intravésicale dans le cas des cancers de la vessie concernant les personnes âgées (Tremblay, 2018). Son volume de distribution est compris entre 500 et 800 L/m<sup>2</sup> (Lal *et al.*, 2010), son demi de vie de distribution initiale est d'environ 5 minutes, sa liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 75%, elle est liée à la concentration de ce médicament (Alkuraishy *et al.*, 2017). Il a été démontré que la DOX pénètre dans les cellules par diffusion passive, et que l'accumulation intracellulaire des concentrations est de 10 à 500 fois supérieure par rapport à celle du milieu extracellulaire (Lal *et al.*, 2010). Intracellulairement, les

concentrations nucléaires de la DOX sont 50 fois plus élevées par rapports aux celles du cytoplasme (Atteignant 340 pM à saturation), ce qui représente une molécule intercalée dans toutes les cinq paires de bases de l'ADN (Zunino *et al.*, 1972 ;Gigli *et al.*, 1989). Tandis que la DOX libre est très faible (0.2 % de la concentration intracellulaire totale du médicament), il est répartis de manière hétérogène en raison de la séquestration dans les organites, tels que les lysosomes, les mitochondries et l'appareil de golgi (Peterson et Trouet, 1978 ; Danesi *et al.*, 2002). La plus forte accumulation de la DOX dans les tissus est observée dans le foie, tandis que les globules blancs et la moelle osseuse séquestrent la DOX à des concentrations de 200 à 500 fois supérieures à celle du plasma (Lal *et al.*, 2010).

### 3. Métabolisme et élimination :

La DOX présente un métabolisme principalement hépatique (Lauzon, 2008), avec des réactions de phase I et de phase II, constitué de trois voies métaboliques, à l'origine de la production de divers métabolites (Fig.9). Les aldokéto-réductases cytoplasmiques sont responsables d'une réduction stéréospécifique de la cétone sur le C-13 de la DOX, donnant la doxorubicinol (DOXol); un métabolite hydrophile se liant également aux protéines plasmatiques (Lal *et al.*, 2010). Des études suggèrent que son volume de distribution, sa clairance et son activité anti-tumorale sont inférieures aux celles du composé parent (Chavalle, 2017; Tremblay, 2018). La DOX peut également subir une réduction à un électron pour former un radical DOX semiquinone, cette réaction peut être catalysée par le cytochrome P450 (CYP450) ou par d'autres enzymes oxydoréductases selon le compartiment concerné, incluant : les NADH déshydrogénases mitochondriales, cytoplasmiques ou sarcoplasmiques, la Xanthine oxydase ou l'oxyde nitrique synthase (Chavalle, 2017). Une dernière voie minoritaire a été décrite, basée sur la déglycosidation de la doxorubicine ou de son principal métabolite, le DOXol. Il existe deux formes d'aglycones, pouvant être produites sous action du CYP450 (Tremblay, 2018) ; une issue de la déglycosidation par hydrolyse catalysée par le glycoside hydrolase, est à l'origine de composés 7-hydroxy-aglycone. L'autre forme est issue de la déglycosidation réductrice par la NADPH-cytochrome c réductase, conduisant à la formation des composés 7-déoxy-aglycones qui peuvent subir une déméthylation par le CYP450 (Keizer *et al.*, 1990; Lal *et al.*, 2010 ; Chavalle, 2017). La DOX et ses métabolites, subissent ensuite des réactions de phase II de type sulfatation ou glucurono-conjugaison afin d'être facilement excrétés (Chavalle, 2017). La clairance de la DOX est principalement induite par voie hépatobiliaire, plus de 50% du médicament est excrété par la bile dans les 7 jours suivant le traitement. Environ 10 à 20% et 40 à 50% de la dose sont excrétés par les fèces en 24h et 150h respectivement (Lal *et al.*, 2010).



Seulement 5 à 12% du médicament serait excrétée par les voies urinaires dans la même période, ce qui explique la couleur rouge des urines (Lauzon, 2008; Alkuraishy *et al.*, 2017). La perfusion intraveineuse de la DOX est suivie d'une clairance plasmatique triphasique, caractérisée par trois demi-vies successives (3 à 5 min, 1 à 2h, 24 à 36h) (Lal *et al.*, 2010).

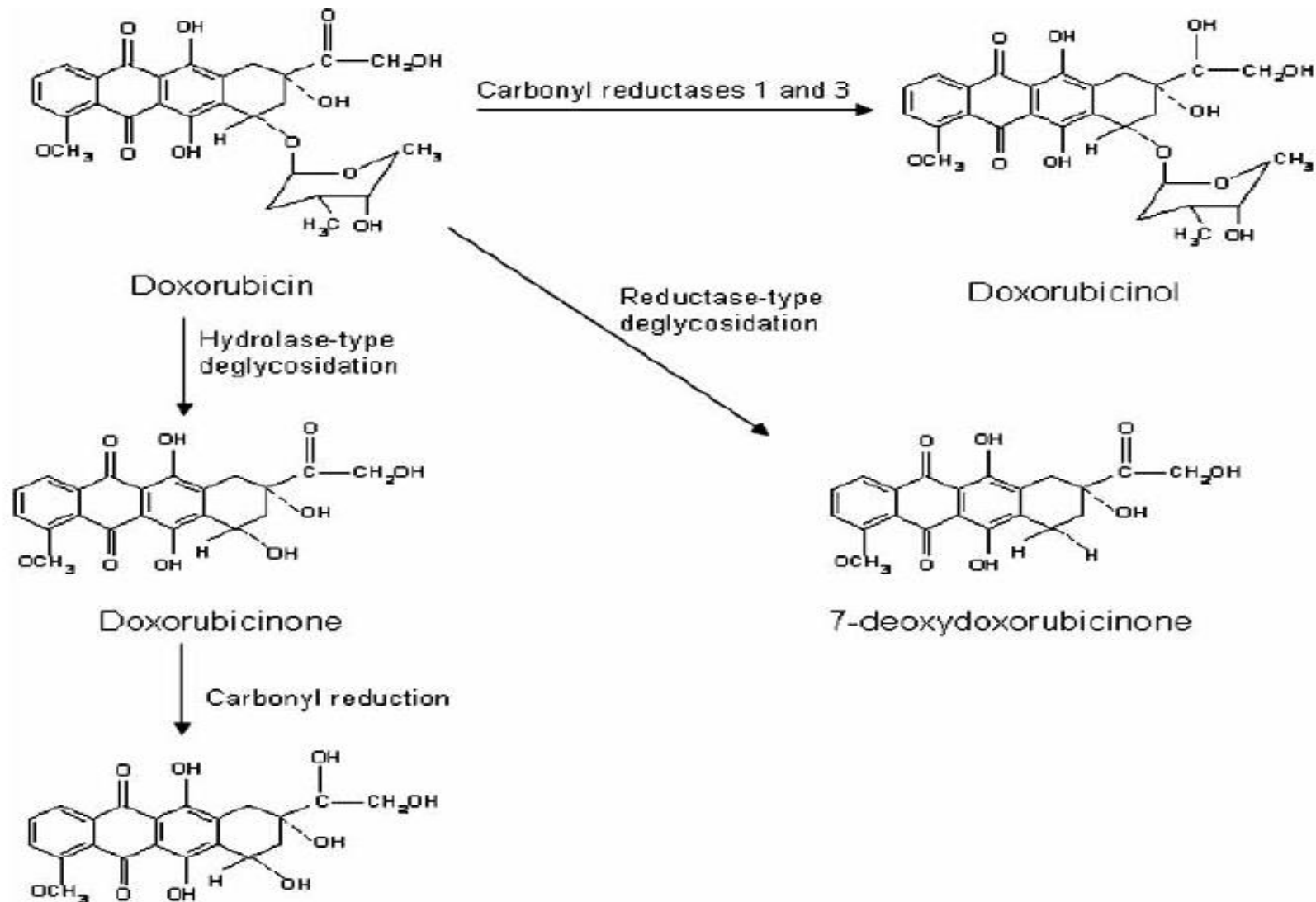


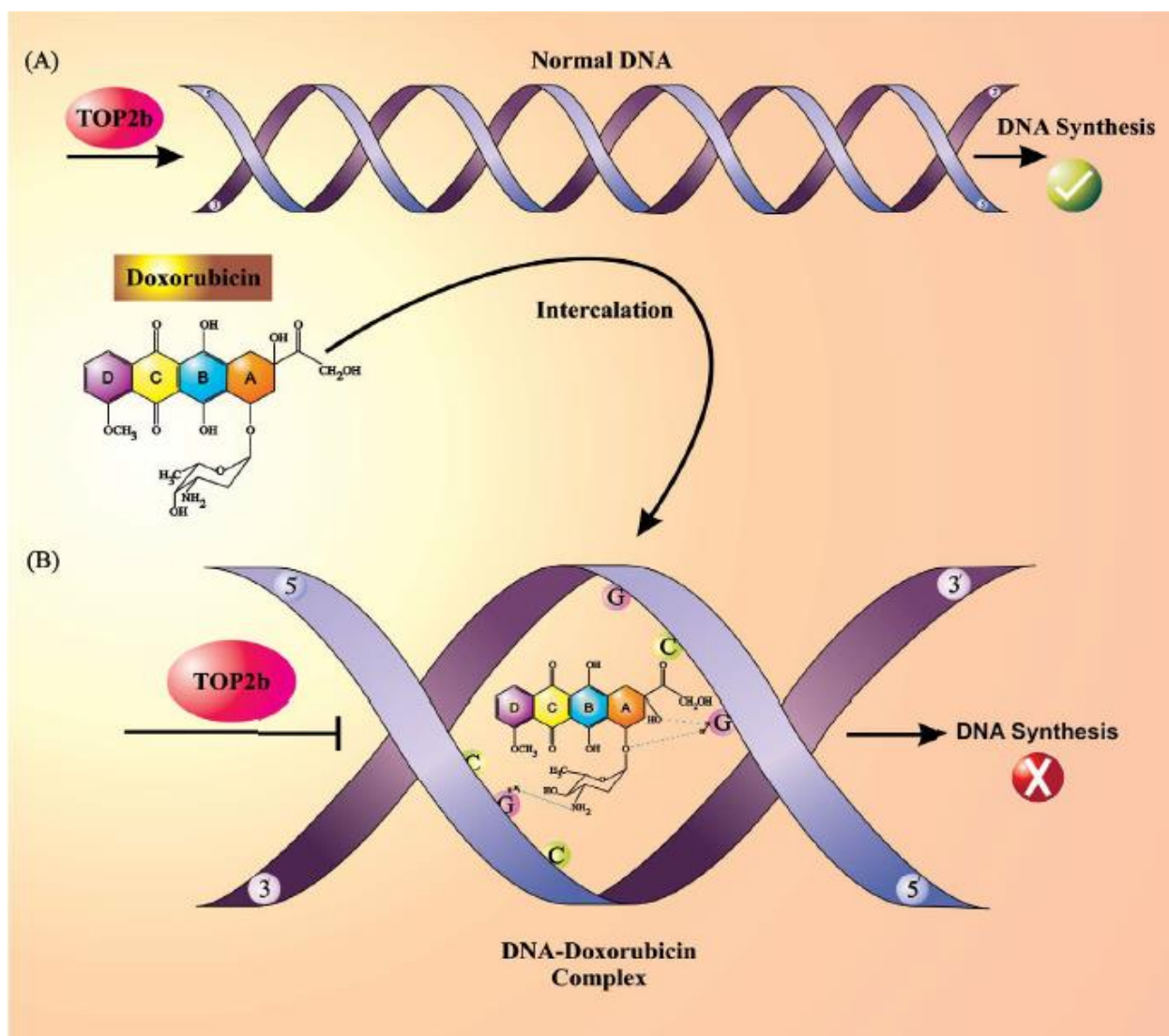
Figure 9: Principales voies de la biotransformation de la DOX (Lal *et al.*, 2010).

#### **4. Mécanismes d'action et toxicité de la DOX:**

L'action de la DOX a fait l'objet des recherches approfondies au cours des dernières décennies (Yang *et al.*, 2014), de nombreux efforts ont été consacrés à la compréhension de son activité anti-tumorale (Keizer *et al.*, 1990). Deux mécanismes différents ont été proposés par les chercheurs pour expliquer le mode d'action de ce médicament : l'intercalation de la DOX dans l'ADN, l'inhibition de l'enzyme topoisomérase II (Top II) et la génération des radicaux libres (RL) et des dommages oxydatifs aux molécules d'intérêt biologique (protéines, lipides et ADN) (Mobaraki *et al.*, 2017 ; Eleiwa *et al.*, 2018 ; Nowrouzi *et al.*, 2019).

##### **4.1. Mécanisme lié aux dommages à l'ADN :**

Une diffusion passive permet l'entrée de la DOX dans le cytoplasme des cellules tumorales (Hermance, 2018), elle se lie à la sous-unité 20 S du protéasome formant ainsi un complexe DOX-protéasome (Carvalho *et al.*, 2009). En raison de sa grande affinité pour l'ADN, ce complexe se déplace vers le noyau via les pores nucléaires, où la DOX se dissocie du protéasome et interagit avec cette molécule (Lauzon, 2008; Carvalho *et al.*, 2009) (Fig.10). La DOX agit en bloquant la synthèse de l'ADN (Granados-Principal *et al.*, 2010), elle s'intercale préférentiellement dans les sites adjacents aux paires de bases guanine-cytosine à cause de la formation d'une liaison d'hydrogène spécifique entre la DOX et la guanine. Ceci induit à un écartement des paires de bases permettant l'intercalation de la DOX. La partie glucidique de ce médicament interagit avec les protéines régulatrices de l'ADN (Mazevet, 2016). De ce fait, la DOX bloque la fixation de certaines enzymes tels que les hélicases, responsables de la séparation des deux brins d'ADN, qui est une étape indispensable dans le processus de sa réplication, sa transcription et sa réparation. La DOX peut également bloquer la synthèse de la Top II (Lyu et Liu, 2012; Badkoobeh *et al.*, 2013) ; une enzyme qui régule l'état d'enroulement d'ADN en générant des coupures double brin sans provoquer des dommages (Sah *et al.*, 2015; Mazevet, 2016). La Top II est nécessaire à la réplication, la transcription et à la condensation de la chromatine et la ségrégation chromosomique (Amandeep *et al.*, 2012). En effet, la DOX se lie avec cette enzyme essentielle et crée un complexe covalent DXO-ADN-Top II, ce qui perturbe la structure de l'ADN et bloque sa synthèse (Granados-Principal *et al.*, 2010). Globalement, ces effets au niveau de l'ADN mènent à l'activation du P53, l'arrêt du cycle cellulaire puis à l'apoptose (Lauzon 2008; Alkuraishy *et al.*, 2017). Toutefois, la mort cellulaire par apoptose n'est pas la seule conséquence biologique possible en réponse aux dommages d'ADN par la DOX ; selon la dose reçue, la durée d'exposition et le type cellulaire, elle pourra être une apoptose, une nécrose, une sénescence ou encore une autophagie (Tremblay, 2018).



**Figure 10:** Mécanisme d'action moléculaire de la DOX (Mobaraki *et al.*, 2017)

#### 4.2. Toxicité de la DOX et stress oxydatif :

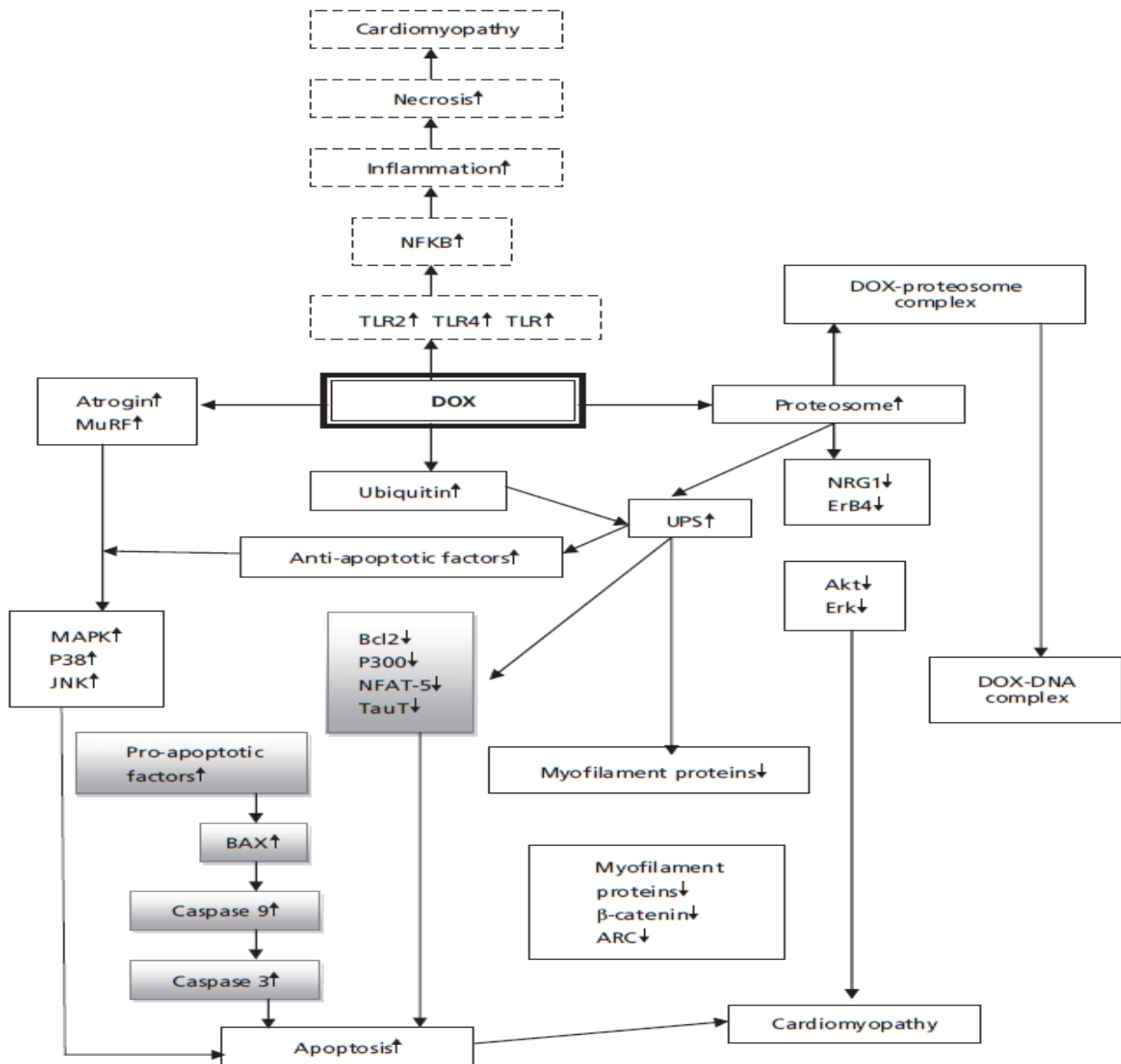
Une large gamme d'effets indésirables toxiques de la DOX sur les différents organes tels que le foie, le cœur, les reins, le cerveau et les testicules ont été rapportés (Badkoobeh *et al.*, 2013; Sah *et al.*, 2015; Farsani *et al.*, 2018).

##### 4.2.1. La cardiotoxicité :

La cardiotoxicité induite par la DOX attire de plus en plus l'attention depuis sa découverte et son introduction en clinique (Carvalho *et al.*, 2009).

Le mécanisme exact par lequel la DOX agit au niveau cardiaque reste controversé (Thorn *et al.*, 2011; Svvs *et al.*, 2013), mais plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer les impacts de ce médicament, en terme d'effets secondaires liés à une augmentation des ROS et au

risque de lésions oxydatives (Shouman *et al.*, 2006; Granados-Principal *et al.*, 2010). Les patients sont affectés différemment en présentant des affections allant de aiguës à chroniques, ce médicament est responsable des altérations structurelles des cardiomyocytes dans le cœur en les agrandissant (Tacar *et al.*, 2013). Les gènes responsables de ce phénomène sont le peptide natriurétique cérébral (BNP) et le peptide natriurétique auriculaire (ANP), lorsqu'ils sont fortement exprimés, ces deux gènes sont responsables de l'hypertrophie cardiaque. Si la DOX est présente, les niveaux de ROS sont déterminés par les récepteurs de type TLR, qui augmentent le niveau du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), le niveau élevé des ROS induit l'activation d'une cascade apoptotique, dont les voies extrinsèques et intrinsèques sont impliquées après une courte période d'exposition (Das *et al.*, 2012). Les indices apoptotiques sont nombreux (régulation positive de Bax, Bad, libération du cytochrome c mitochondrial en cytosol, clivage de la caspase-9, diminution de l'expression du Bcl-2, augmentation du niveau des caspase-8 et de Bid) (Yeh *et al.*, 2007). Cependant, la DOX peut stimuler l'apoptose cellulaire via l'activation des MAPK, P53 et JNK, qui répondent à la fois aux dommages de l'ADN et au stress oxydatif pour déclencher une signalisation apoptotique (Yeh *et al.*, 2009) (Fig.11).



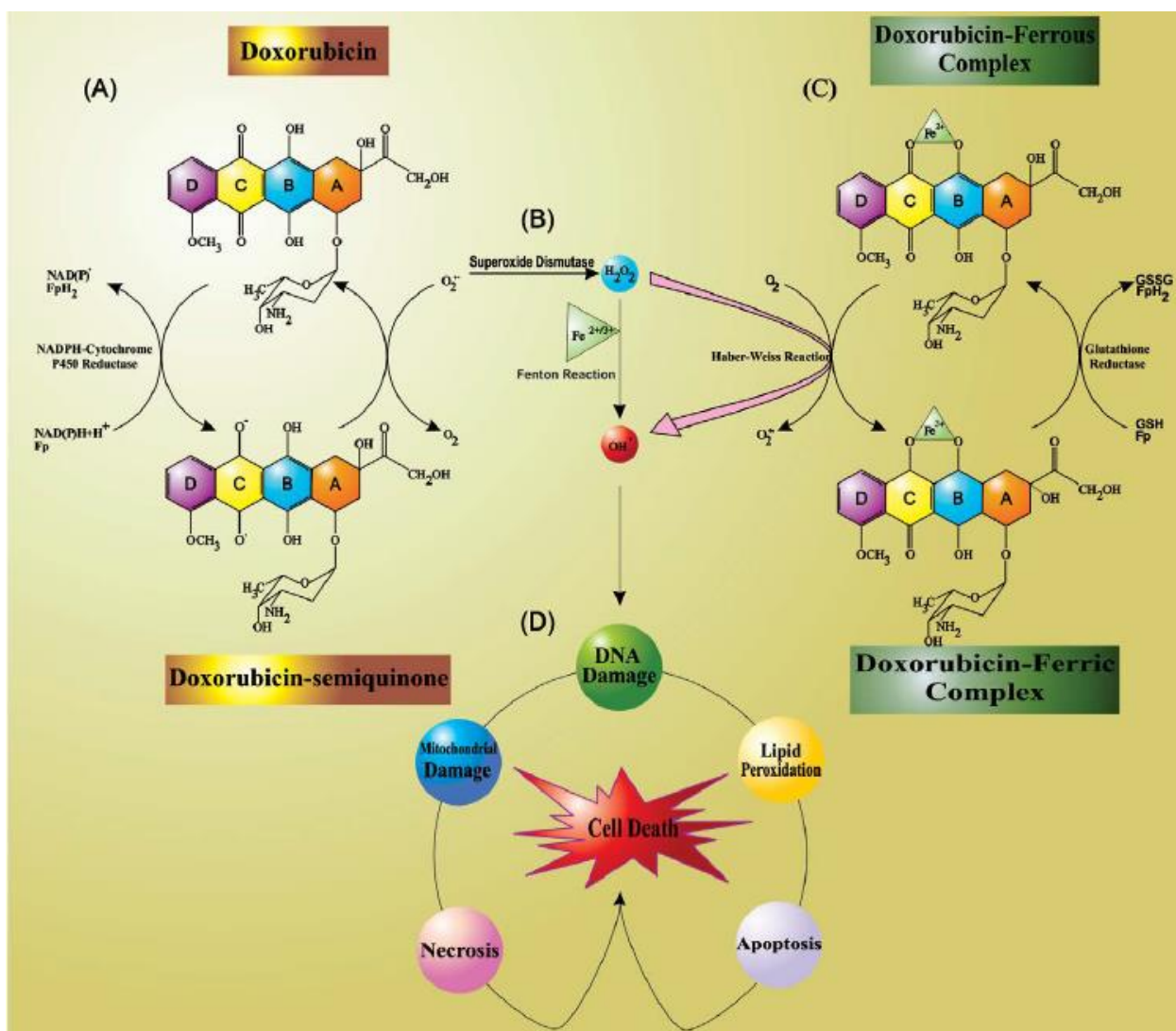
**Figure 11:** Mécanisme moléculaire de la cardiotoxicité induite par la DOX (Tacar *et al.*, 2013)

Si l'accumulation de la DOX au cours de la vie s'approche à 500 mg/m<sup>2</sup>, le risque de cardiomyopathie s'augmente souvent, entraînant une insuffisance cardiaque congestive chez 20% des patients. (Saltiel et McGuire, 1983; Lauzon, 2008; Carvalho *et al.*, 2009 ; Koleini *et al.*, 2019). D'autres études ont exploré la régulation négative de la protéine de liaison (GATA-4), l'activation du P53 et la dégradation du P300 (Tacar *et al.*, 2013). Ces protéines étant affectées par l'administration de la DOX, conduisent à l'apoptose des cardiomyocytes (Kim *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2008). GATA-4 est un facteur de transcription connu, qui agit sur les cardiomyocytes

postnatales et différenciés en tant que facteur de survie et active le gène anti-apoptotique Bcl-xL (Shi *et al.*, 2011).

### A. La DOX et production des ROS :

Bien que la cardiotoxicité induite par la DOX soit multifactorielle, la formation des ROS joue un rôle majeur dans la production des dommages oxydatifs de myocarde (Torres et Simic, 2012). La production élevée des radicaux libres par la DOX tient aux caractéristiques moléculaires qui permettent à ce médicament de subir facilement une réaction redox, puis une cascade de formation des radicaux libres (Xu *et al.*, 2005). La forme quinone est la forme initiale de la DOX, elle peut être réduite en radical semiquinone par l'addition d'un électron (Xu *et al.*, 2005), cette réduction est catalysée par différentes enzymes réductases comme la NADPH cytochrome P450 réductase (Quiles *et al.*, 2002; Granados-Principal *et al.*, 2010 ; Mobaraki *et al.*, 2017). L'électron perdu par la semiquinone lors de son oxydation, sera capté par une molécule d'oxygène ( $O_2$ ) pour former l'anion Superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), qui sera à son tour oxydé par la Superoxyde Dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ; une molécule stable, moins toxique, qui peut être transformée par des enzymes anti-oxydantes en eau et en oxygène (Mazevet, 2016). Cependant, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent générer des radicaux hydroxyles ( $OH^{\bullet}$ ) via la réaction d'Haber Weiss; une réaction lente qui pourra être catalysée par certains métaux et plus particulièrement le Fer ( $Fe^{2+}$ ). Le  $OH^{\bullet}$ , hautement instable, capable d'endommager les biomolécules et il peut également être généré par la réaction de Fenton, générant ainsi l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) (Koleini *et al.*, 2019). Un autre mécanisme non enzymatique a été décrit où la DOX interfère avec les réactions métaboliques non enzymatiques dans lesquelles le Fer est impliqué (Castel *et al.*, 2013). Ceci conduit à la production des ROS qui favorisent la libération du Fer par la Ferritine (une protéine permettant le stockage du Fer) et l'aconitase cytoplasmique, perturbant ainsi le métabolisme du Fer (Granados-Principal *et al.*, 2010; Castel *et al.*, 2013; Mazevet, 2016). L'ensemble de ces évènements, provoque des dommages aux cellules (oxydation des biomolécules), induisant ainsi une peroxydation lipidique, une apoptose et une nécrose. (Thorn *et al.*, 2011; Hermance, 2018) (Fig.12).



**Figure 12:** Les Voies d'induction du stress oxydatif par la DOX (Mobaraki *et al.*, 2017)

## B. Le dysfonctionnement mitochondrial :

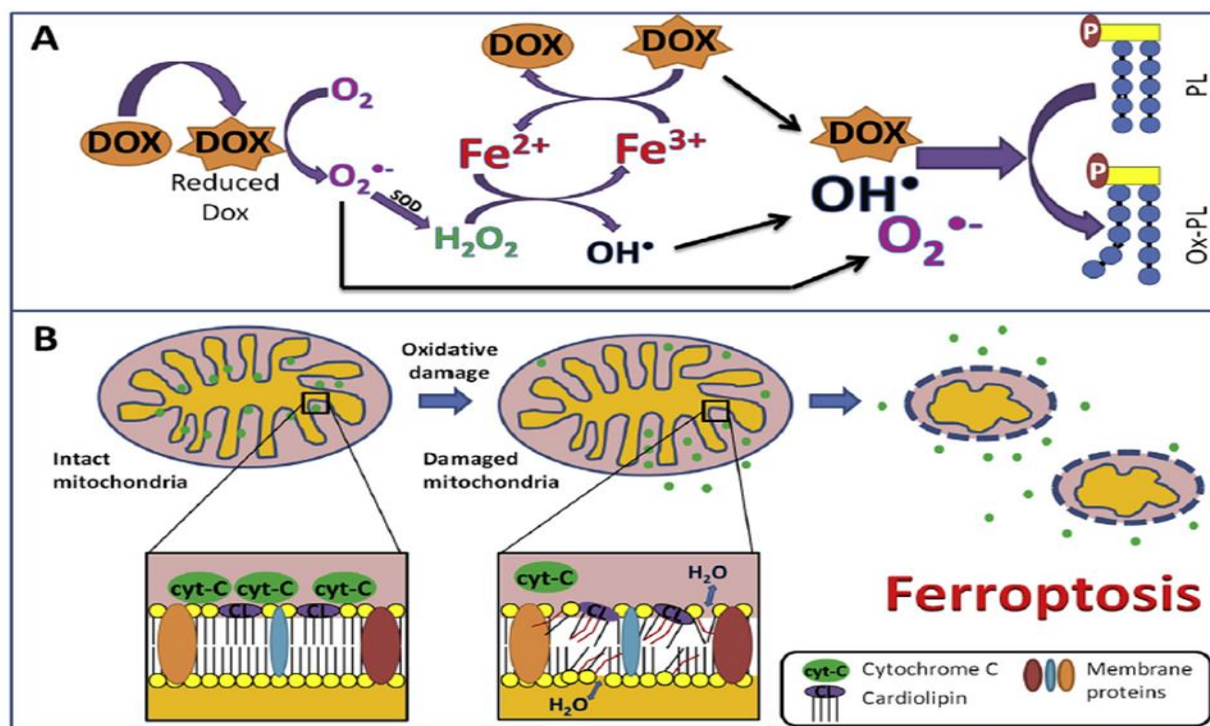
- **DOX et ferroptose :**

La DOX a une grande affinité pour la cardiolipine (CL) ; un phospholipide riche en acides gras (AG) insaturés, située dans la membrane interne mitochondriale (Mobaraki *et al.*, 2017), induisant ainsi une accumulation de la DOX dans les cellules cardiaques (De Wolf, 1991 ; Granados-Principal *et al.*, 2010) (Fig.12).

Au cours de la phosphorylation oxydative qui implique le fer dans les mitochondries, les cellules produisent des ROS en même temps que la génération d'ATP (Koleini *et al.*, 2019). Cependant, les ROS générés oxydent les phospholipides (PL) en modifiant leur structure fonctionnelle et leur polarité en Ox-PL, lors de l'oxydation de la cardiolipine qui se situe avec le cytochrome c (Cyt c) dans la membrane mitochondriale interne, le Cyt c est libéré où il



s'accumule dans l'espace inter-membranaire, ensuite il migrera vers le cytosol (Mobaraki *et al.*, 2017). En outre, les Ox-PL créent dans les membranes des pores de transition mitochondriale perméables (MPT), qui permettent un passage non régulé de l'eau, ce qui entraîne un gonflement des mitochondries (Granados-Principal *et al.*, 2010). Un excès d'Ox-PL et de fer conduit à une ferroptose, une forme de mort cellulaire régulée (Fig.13).

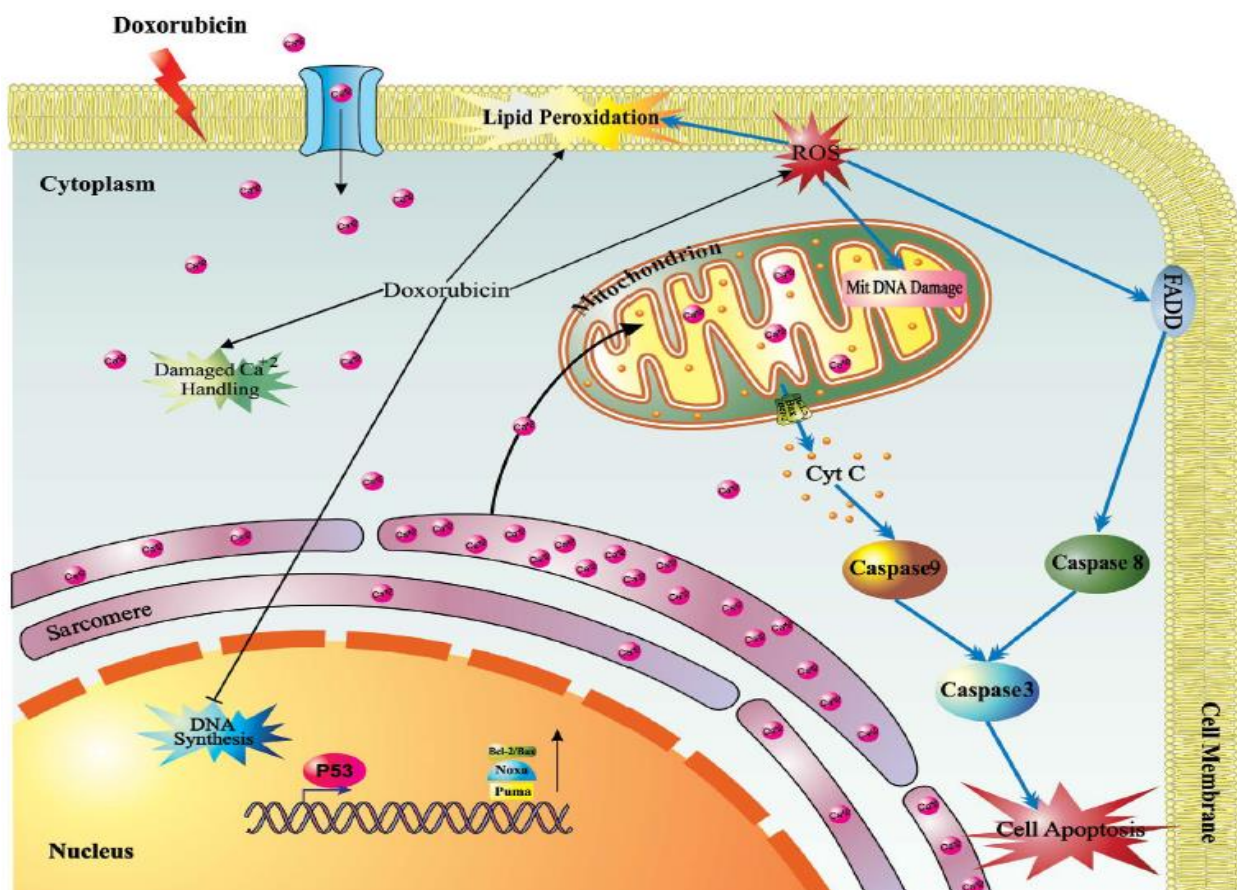


**Figure 13:** Mécanisme de l'oxydation des phospholipides induite par la DOX, à l'origine d'une ferroptose dans les cardiomyocytes (Koleini *et al.*, 2019)

- **DOX et apoptose :**

La DOX est un agent pro-apoptotique bien connu, elle entraîne la formation des ROS, la peroxydation des lipides, des lésions de l'ADN et des mitochondries, une altération de la gestion du calcium, l'induction de P53 et des voies apoptotiques. L'hypothèse actuelle de l'apoptose, du nécrose et de certaines formes de mort cellulaire programmées inclue l'ouverture prolongée d'un pore conducteur dans les mitochondries; le pore de transition et de perméabilité mitochondriale (mPTP) (Minotti *et al.*, 2001). La perméabilité des canaux calciques est accrue après l'entrée de la DOX, elle entraîne l'augmentation du taux de calcium chez les sarcomères dans le cytoplasme et les mitochondries ce qui conduit à un gonflement cellulaire (Alkuraishy *et al.*, 2017). Lors de l'activation de la voie P53, l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bcl-2 / Bax, Puma, Noxa) est augmentée, ce qui abouti à un efflux du Cyt C au cytoplasme (Yeh *et al.*, 2007 ; Mobaraki *et al.*, 2017) , le Cyt C déclenche ainsi l'activation de la caspase 9 puis de la caspase 3

effectrice et induit l'apoptose. De plus, les ROS générées déclenchent l'activation de la caspase 8 puis de la caspase 3, ce qui déclenche l'apoptose par interaction avec la FADD. La doxorubicine bloque par intercalation la synthèse de l'ADN et par la suppression de Top 2b (Fig.14).

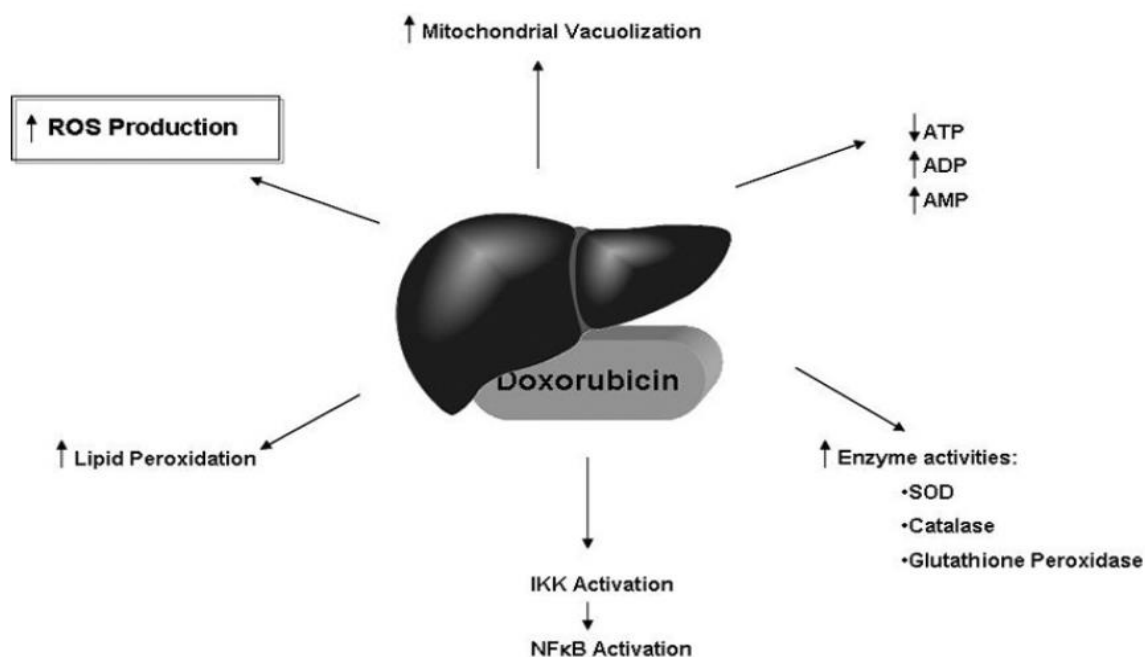


**Figure 14:** Induction de la mort cellulaire par la DOX (Mobaraki *et al.*, 2017)

#### 4.2.2. L'hépatotoxicité :

Le foie est le principal organe responsable du métabolisme des médicaments, notamment la DOX (Carvalho *et al.*, 2009), il a été démontré que 40 % des patients traités souffrent d'une forme de lésion hépatique (Tacar *et al.*, 2013). Le métabolisme des concentrations élevées de la DOX induit à une surproduction des ROS et des dommages oxydatifs (Tacar *et al.*, 2013), par conséquent, ces ROS altèrent plusieurs structures et fonctions biologiques nécessaires, provoquant ainsi des dommages oxydatifs accrus, tels que les dommages à l'ADN, la peroxydation lipidique, la diminution du taux de la vitamine E et des niveaux du glutathion réduit (GSH), ce qui contribue à un déséquilibre oxydatif confirmant l'hépatotoxicité de la DOX (Thayer, 1988; Odom *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 2008). La surproduction des ROS peut également entraîner l'activation de la kinase I $\kappa$ B (I $\kappa$ K), qui phosphoryle les inhibiteurs d'I $\kappa$ K pour activer le facteur nucléaire kappaB (NF $\kappa$ -B), ce dernier active ensuite les cytokines pro-inflammatoires

pour provoquer l'apoptose. (Lu *et al.*, 2005). La DOX agit également en provoquant une diminution des taux de phosphate inorganique, à la fois d'ADP et d'ATP ainsi que d'AMP, ceci aboutit à des conditions pathologiques dans les hépatocytes (Fig.15). Cependant, pour que le mécanisme d'homéostasie fonctionne, un approvisionnement constant en ATP est nécessaire pour alimenter le processus, et puisque la doxorubicine entraîne une diminution de l'ATP, la capacité de la cellule à effectuer des tâches dépendantes de l'énergie se diminue également ; c'est l'une des raisons pour lesquelles les patients en chimiothérapie commencent à s'affaiblir et à ressentir une fatigue musculaire et mentale constante (Tacar *et al.*, 2013).



**Figure 15:** La toxicité médiée par la DOX dans le foie (Carvalho *et al.*, 2009)

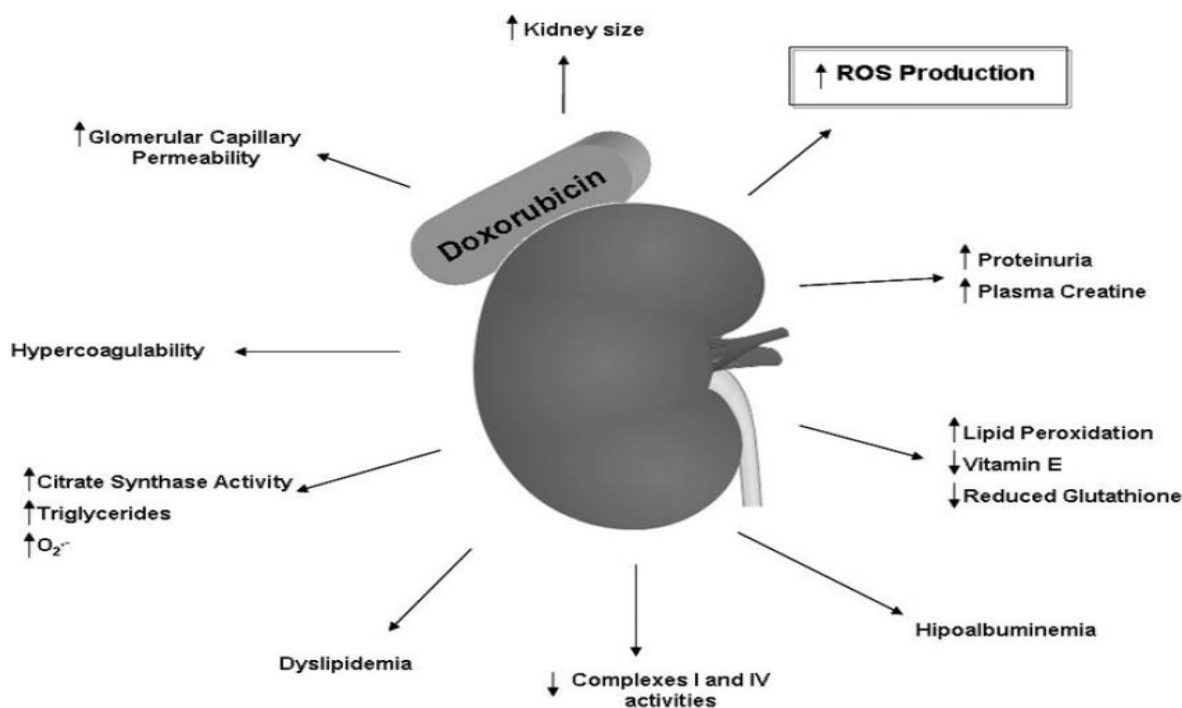
#### 4.2. 3. La néphrotoxicité :

Plusieurs études ont montré que la DOX provoque des lésions au niveau des glomérules via la production des radicaux libres et l'induction du stress oxydatif, aboutissant ainsi à une néphropathie (Gallani, 1889), qui est à l'origine d'une glomérulosclérose (Carvalho *et al.*, 2009). Parmi les troubles rénaux provoqués par la DOX, on trouve la protéinurie, l'augmentation du taux de créatinine plasmatique, l'hypo-albuminémie, la lipidémie, l'hypercoagulabilité, l'augmentation de la taille des reins et la perméabilité capillaire glomérulaire (Gallani, 1889; Tacar *et al.*, 2013) (Fig.16).

La DOX interfère également avec la fonction mitochondriale (Liu *et al.*, 2016), ce qui entraîne une diminution de l'activité des complexes I et IV mitochondriaux, une augmentation de

l'activité du citrate synthase, des niveaux de triglycérides (TG) et de Superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ) (Tacar *et al.*, 2013). De plus, la DOX peut induire une peroxydation lipidique au niveau glomérulaire (Liu *et al.*, 2016), diminuant ainsi le niveau des composés antioxydants, de la vitamine E et du glutathion réduit (GSH) (Carvalho *et al.*, 2009).

Contrairement au foie, la capacité du rein à se régénérer est faible, ce qui réduit sa capacité à se guérir lorsque les glomérules sont endommagés ; cela augmente le degré de susceptibilité aux dommages dans tout le corps, en particulier le rein lui-même en raison de son rôle majeur dans la régulation de la composition chimique du sang et le maintien de l'équilibre homéostatique (Tacar *et al.*, 2013). L'altération des glomérules est connue pour provoquer une hypertension, une résistance aux stéroïdes et une protéinurie, entraînant éventuellement une insuffisance rénale (Carvalho *et al.*, 2009).



**Figure 16:** La néphrotoxicité induite par la DOX (Carvalho *et al.*, 2009)

#### 4.2. 4. Les effets protecteurs des antioxydants vis a vis la toxicité de la DOX :

La toxicité induite par la DOX au niveau du cœur, du foie et des reins peut être réduite par l'effet bénéfique des antioxydants qui vont jouer un rôle antagoniste. Ces antioxydants peuvent être d'une origine exogène, apportés par le régime alimentaire ou d'une origine endogène (Tableau 1).

**Tableau 1:** Les défenses antioxydantes vis-à-vis des dommages oxydatifs induits par la DOX au niveau du coeur, du foie et des reins (Granados-Principal *et al.*, 2010)

<b>Composé</b>	<b>Effet contre l'action de DOX</b>	<b>Organes protégés contre la toxicité de DOX</b>	<b>Effets sur chimiorésistance Thérapeutique</b>	<b>Efficacité thérapeutique de la DOX</b>
Vitamin E Diminution	ROS Peroxydation lipidique Aberrations chromosomiques Ulcérations gastriques Les marqueurs sériques de toxicité empêchent les modifications de l'ECG	Coeur Foie Reins Peau	Augmentation	Touché?
augmentation	Génération de la peau HIF-1 $\alpha$ P-gp			
Vitamin C Augmentation	ROS Peroxydation lipidique	Coeur (faible) foie ( faible)	Diminué	Non affecté ou diminué?
Augmentation	P-gp			
Caroténoïds: $\beta$ -carotène, Lycopène diminution	ROS La peroxydation lipidique normalise l'histopathologie et le sérum et marqueurs tissulaires de toxicité	Coeur Reins	Inconnu	Augmentation ( $\beta$ -carotène)
Vitamin A Diminution	ROS Peroxydation lipidique Aberrations chromosomiques	cœur Reins Foie Moelle osseuse Cerveau	Inconnu	Non affecté
Coenzyme Q diminution	ROS Peroxydation lipidique Protège MTC	Coeur	Inconnu	Non affecté
Flavonoïdes: monoHER, catéchines, quercetin, ginestein Diminution	Chélateurs du fer ROS Peroxydation lipidique Apoptose des myocytes Pompe à efflux	Coeur Foie	Réduit	Augmenté
Augmenté	Accumulation de DOX à l'intérieur des cellules			
Garlic diminué	ROS TNF- $\alpha$ P-gp	Coeur	Réduit	Augmenté

Polyphénols: curcumin, resveratrol diminution	ROS, Peroxydation lipidique Protection des membranes Pompe à Efflux	Coeur Foie Reins	Réduit	Augmenté
augmentation	Accumulation de DOX à l'intérieur des cellules Enzymes antioxydantes			
Oleuropeine l'huile d'olive Diminution	ROS Peroxydation lipidique et protéique Marqueurs de toxicité sérique Vacuolisation dans les myocytes Restaure les voies métaboliques d'énergie en détresse	Coeur	Inconnu	Inconnu
Selenium Diminution	ROS	Coeur, foie(faible)	inconnu	Inconnu
augmentation	Enzymes Antioxydantes	Reins (faible)		

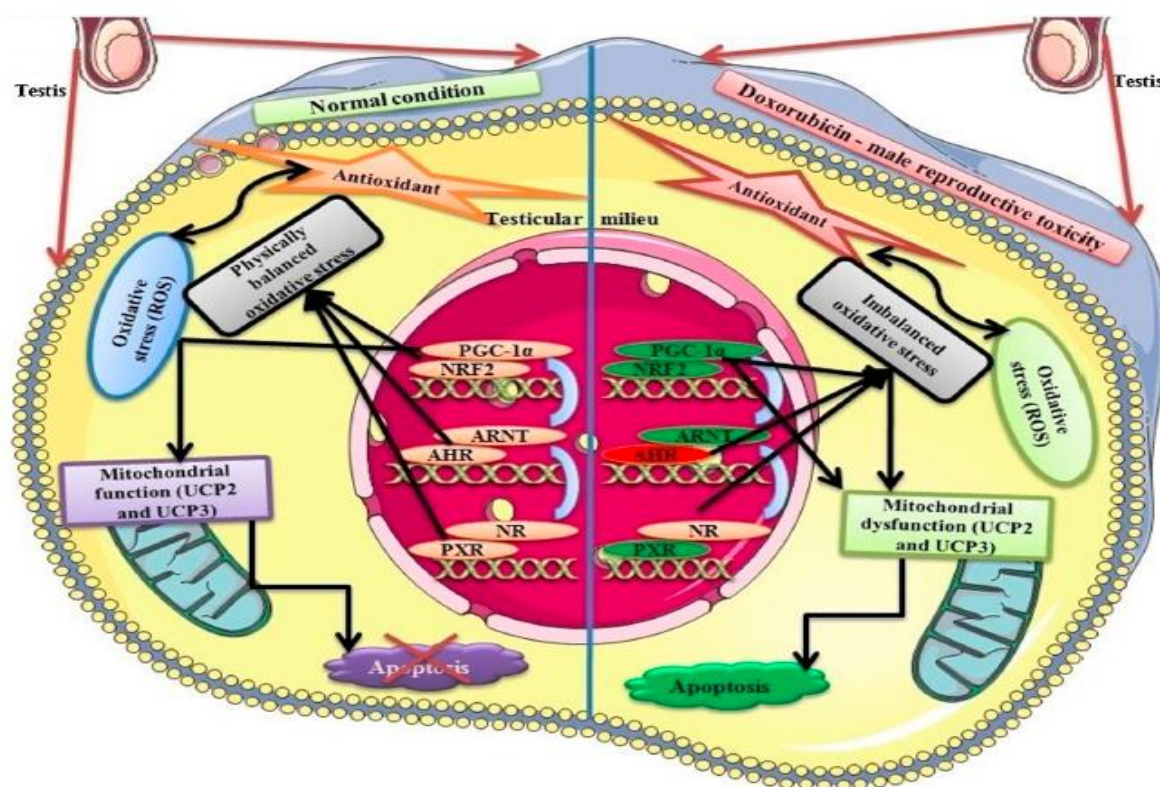
#### 4.2.5 Effets toxiques de la DOX sur les testicules :

Les testicules sont parmi les organes les plus fréquemment touchés car ils possèdent des populations de cellules à renouvellement automatique et rapide (Sridevi, 2011 ; Das *et al.*, 2012). Bien que la concentration de ce médicament soit beaucoup plus faible dans les testicules que dans d'autres tissus en raison de la présence d'une barrière hémato-testiculaire (Hughes *et al.*, 1998 ; Xin *et al.*, 2012). Le traitement par la DOX, provoque une altération du processus de la spermatogenèse, une réduction du nombre de spermatozoïdes qui sont ciblés grâce à leur activité mitotique élevée, une diminution du taux des spermatozoïdes mobiles, ainsi qu'une augmentation du taux de spermatozoïdes morphologiquement anormaux (Yeh *et al.*, 2007; Hozayen, 2012; Xin *et al.*, 2012; Nasr, 2017 ; Eleiwa *et al.*, 2018). La diminution de la quantité des spermatozoïdes associée à la diminution du nombre d'épithéliums séminifères, pourrait être la cause possible de la diminution du poids testiculaire qui dépend principalement du nombre d'épithéliums germinaux et de cellules germinales (Nowrouzi *et al.*, 2019).

- **Induction du stress oxydatif:**

Bien qu'un certain nombre de mécanismes toxiques potentiels ont été identifiés suite à une exposition à la DOX, le principal mécanisme pathogène semble être la production des espèces réactives oxygénés et l'induction du stress oxydatif (Xin *et al.*, 2012 ; Olusoji *et al.*,

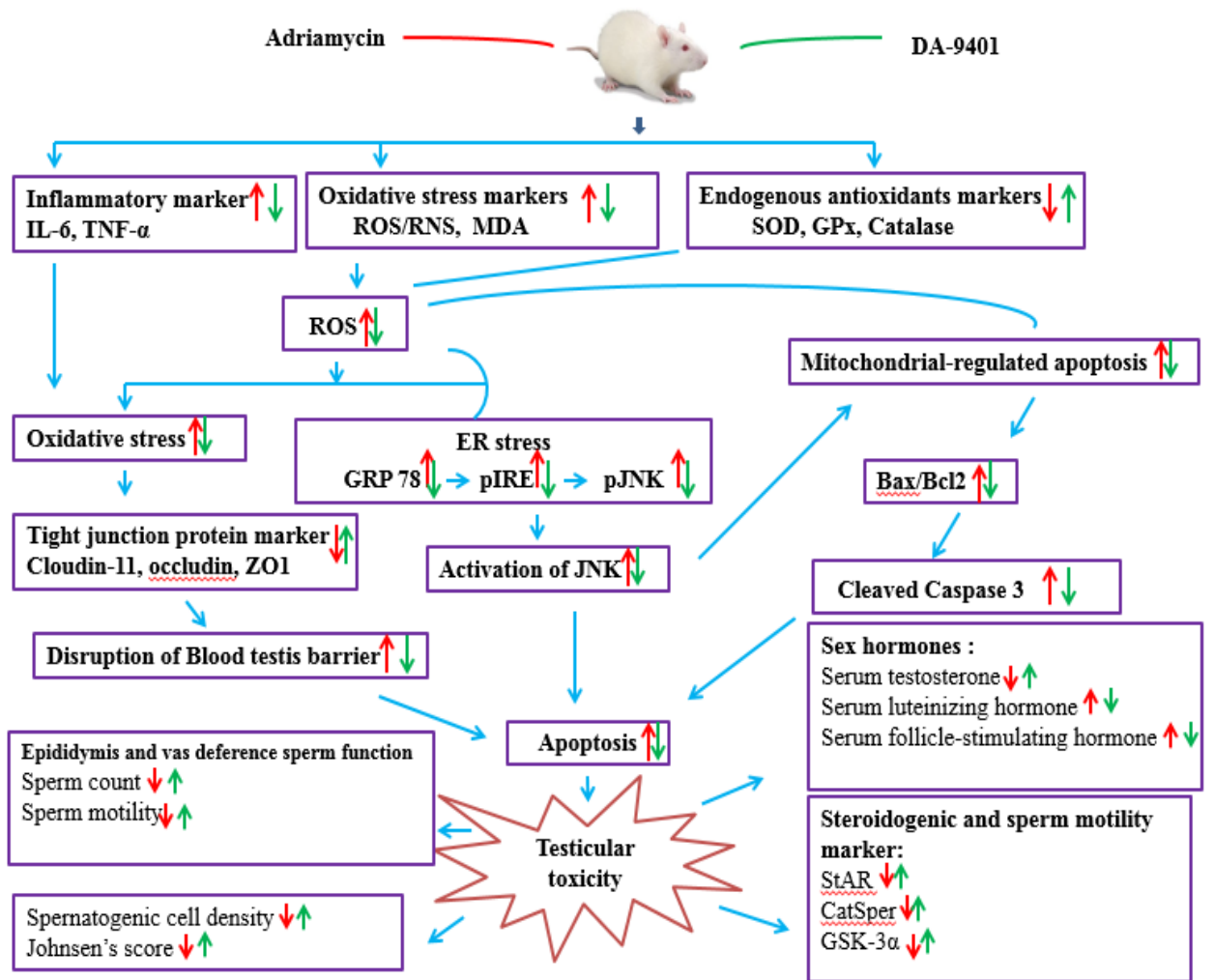
2016 ;Haghi-Aminjan *et al.*, 2018). Les ROS générés, diminuent l'activité des enzymes anti-oxydantes (Yeh *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2012; Asadi *et al.*, 2017 ; Eleiwa *et al.*, 2018) . Il est important de signaler que le tissu testiculaire a intrinsèquement un déficit dans un composant puissant de la famille SOD, la Mn-SOD (SOD2) (Yeh *et al.*, 2007), ce qui le rend plus exposé aux dommages oxydatifs induits par la DOX, y compris la dénaturation des protéines, la fragmentation de l'ADN(Nasr, 2017) et une peroxydation lipidique élevée qui est le résultat d'une dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés qui se localisent au niveau des membranes des spermatozoïdes (Hozayen, 2012; Mohamed *et al.*, 2015). Basant sur ce concept, Le résultat de ces évènements se traduit par une accumulation d'une variété de peroxydes de lipides et de malondialdéhyde (MDA), qui est un marqueur fiable de la peroxydation lipidique (Yeh *et al.*, 2009; Hozayen, 2012 ; Türedi *et al.*, 2015).Le stress oxydatif accru qui est induit par la DOX, déclenche une cascade de signalisation cellulaire (Yeh *et al.*, 2007), et conduit à l'apoptose des cellules germinales (Das *et al.*, 2012; Renu et Valsala, 2019) (Fig.17), entraînant l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B et l'augmentation de l'expression du MAPK, P53, la caspase-3 effectrice et d'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Trivedi *et al.*, 2011; Hozayen, 2012).Cependant, l'administration des antioxydants tels que le DA-9401 peut diminuer la toxicité de la DOX (Fig.18).



**Figure 17:** Stress oxydatif et apoptose induits par la DOX au niveau du tissu testiculaire (Renu et Valsala, 2019).

La DOX exerce également ses effets d'une manière directe par perturbation du contrôle de rétroaction négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Eleiwa *et al.*, 2018), son action sur les cellules de Leydig entraîne une diminution de la production de la testostérone (Vijay *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2015; Haghi-Aminjan *et al.*, 2018; Nowrouzi *et al.*, 2019). Il a été également rapporté que le traitement à la DOX peut diminuer l'expression de 3 $\beta$ -HSD et de 17 $\beta$ -HSD ; des enzymes clés de l'androgénèse testiculaire (Rizk *et al.*, 2014). L'expression de l'ARNm du StAR, un transporteur du cholestérol à travers la membrane mitochondriale qui est considérée comme une étape indispensable dans le processus de stéroïdogénèse, a été également réduite après l'exposition à la DOX (Das *et al.*, 2012). Tous ces effets néfastes induisent une infertilité masculine au futur (Brilhante *et al.*, 2011 ; Shalizar Jalali et Hasanzadeh, 2013 ; Nowrouzi *et al.*, 2019).

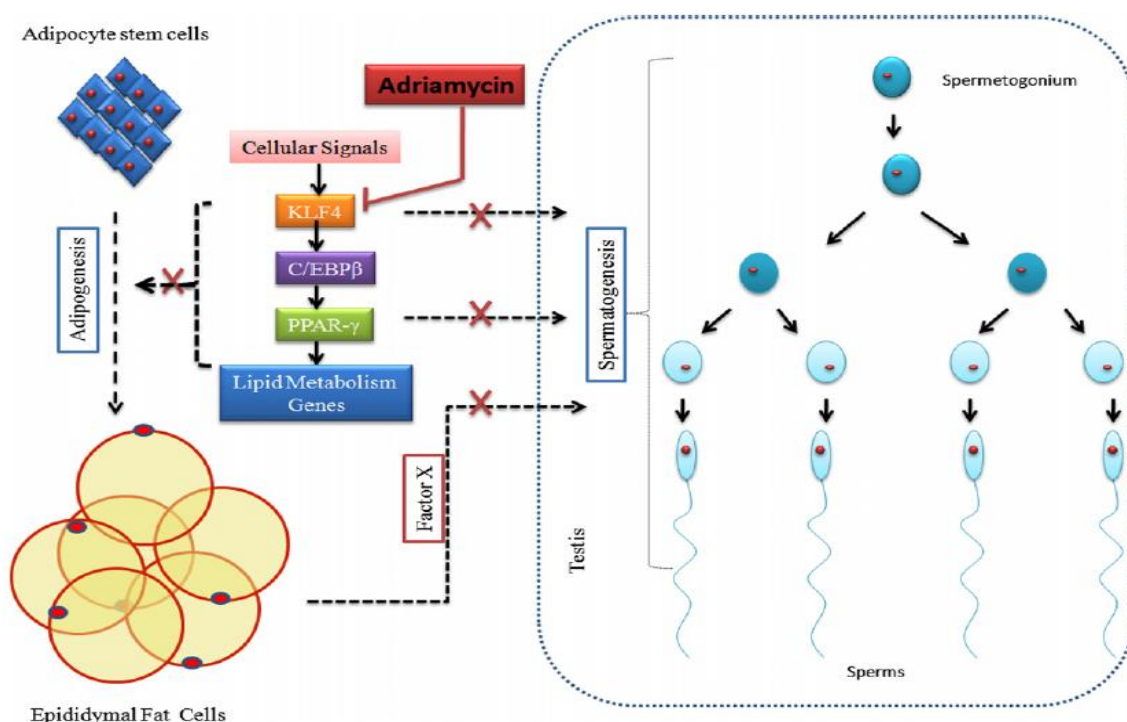




**Figure 18:** Toxicité testiculaire induite par la DOX et le rôle de DA-9401 comme un antioxydant (Karna *et al.*, 2019)

• **La DOX et spermatogenèse :**

Le tissu adipeux blanc épидидymal (EWAT) est nécessaire à la spermatogenèse normale, il synthétise le facteur X ; une molécule inconnue qui joue un rôle crucial dans la spermatogenèse. Le traitement par la DOX provoque une réduction d'EWAT et une diminution du taux de facteur X, ceci induit une altération de la spermatogenèse. La DOX peut également inhiber le PPAR- $\gamma$ , le facteur de transcription KLF-4 et régule ainsi négativement le processus d'adipogenèse nécessaire au maintien de la masse d'EWAT. La diminution de l'ensemble de ces facteurs entraînera une perturbation dans le processus de la spermatogenèse (Fig.19).



**Figure 19:** Effet de la DOX sur le processus de la spermatogénèse (Tirupathi Pichiah *et al.*, 2012)

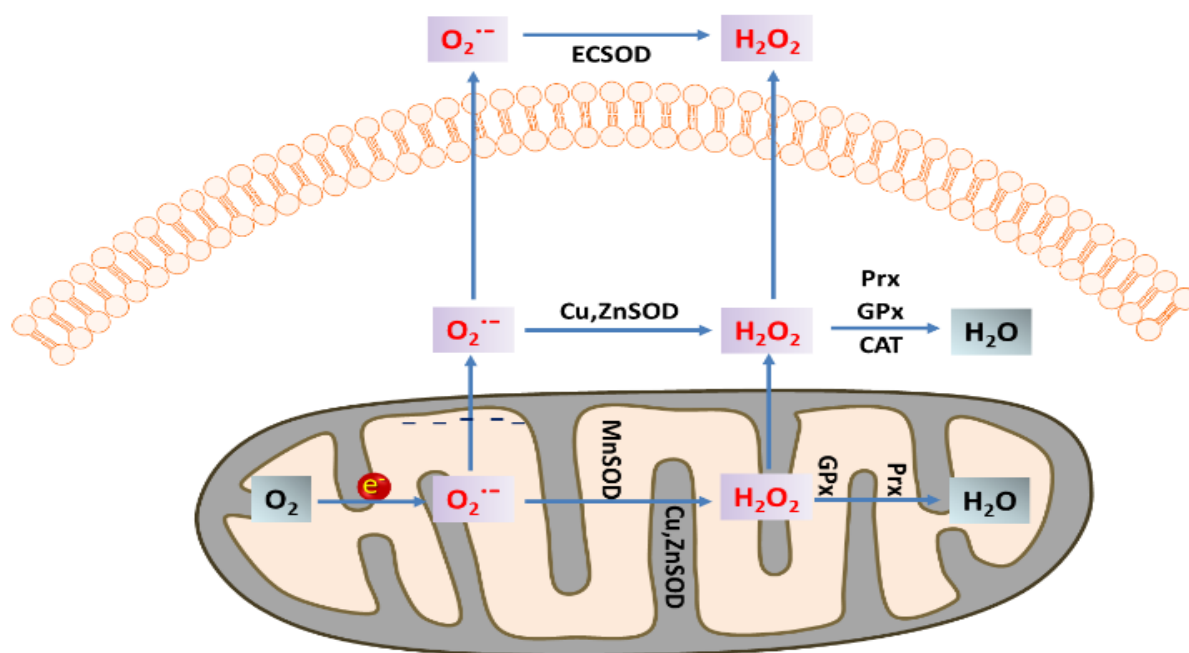
## 5. Les défenses antioxydantes vis-à-vis les dommages oxydatifs induits par la DOX :

Un antioxydant est une molécule stable qui donne un électron à un radical libre qui est hautement instable afin de supprimer ou réduire ses effets néfastes (Kumar *et al.*, 2017). Il existe plusieurs types d'antioxydants qui peuvent être d'une nature enzymatique ou non enzymatique.

### 5.1. Les antioxydants enzymatiques :

#### 5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) :

Le SOD est une enzyme antioxydante qui régule le niveau des ROS en désactivant l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le transformant en peroxyde d'hydrogène (Menvielle-Bourg, 2005; Mates, 2000). Ce mécanisme de dismutation implique une alternance entre la réduction et la réoxydation des métaux de transition tel que le cuivre (Cu) et le manganèse (Mn) (Fukai et Ushio-Fukai, 2011). Basant sur ce concept, il existe trois isoformes du SOD, la Cu/Zn SOD (ou SOD1 cytosolique), la SOD2 ou Mn/SOD et ECSOD (ou SOD extracellulaire) (Zelko et al, 2002 ; Afonso *et al.*, 2007) (Fig.20).



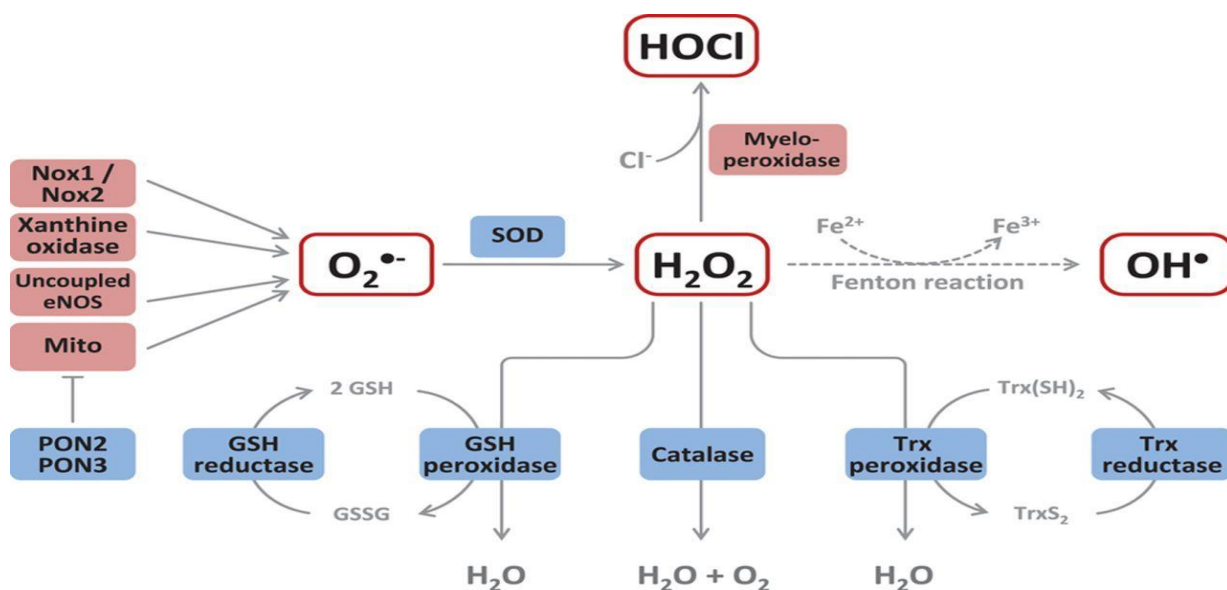
**Figure 20:** Rôle des différents types de SOD dans la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Robert, 2016)

### 5.1.2. Les glutathions peroxydaes (GPx):

Le GPx est une sélénoprotéine (Akbas et al, 2005), formée de quatre sous-unités, chacune contient un atome de sélénium incorporée dans une molécule de sélénocystéine. Les GPx sont des enzymes importantes qui interviennent dans la désintoxication des ROS protégeant ainsi les cellules des dommages oxydatifs (Islam *et al.*, 2015) ; ils catalysent la destruction des peroxydes d'hydrogène (Fig.21) (Haleng *et al.*, 2007). Chez les eucaryotes, plusieurs types de GPx ont été identifiés selon leur localisation ; le GPx-1 cytoplasmique et mitochondrial, le GPx-2 gastro-intestinal, le GPx-3 plasmique, le GPx-4 situé à l'interface de la membrane interne du cytoplasme et le GPx-5 épидidymaire (Comhair et Erzurum, 2002).

### 5.1.3. Catalase (CAT):

La CAT est une enzyme intracellulaire qui protège l'environnement cellulaire des effets néfastes du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa dégradation en eau et en oxygène (Bonfont-Rousselot et al, 2003 ; Dash et Phillips, 2013 ; Kehili *et al.*, 2017) (Fig.21). Cependant, cette enzyme est disponible au niveau des peroxysomes où le peroxyde d'hydrogène est présent (Cillard et Cillard, 2006), mais aussi dans les mitochondries et dans les érythrocytes (Deaton et Marlin, 2003). Cette hémoprotéine agit en synergie avec le SOD (Aouacheri *et al.*, 2009).



**Figure 21:** Les enzymes antioxydantes qui interviennent dans la désintoxication des ROS (Förstermann *et al.*, 2017)

## 5. 2. Les antioxydants non enzymatiques :

### 5.2.1. Le glutathion réduit (GSH) :

Le glutathion  $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine, un tripeptide intracellulaire qui joue un rôle multifactoriel dans les mécanismes de défense antioxydants (Gardés-Albert *et al.*, 2003). C'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité de GPx et la GST (Kehili *et al.*, 2017). Le GSH intervient dans le cycle de deux vitamines antioxydantes ; la vitamine E et la vitamine C (Powers et Jackson, 2008; Honda *et al.*, 2017). Il participe dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire sous l'action du GPx et du glutathion-S-transférase (GST), et il existe deux formes principales : le thiol (GSH) et le disulfure (GSSG).

### 5.2.2. La vitamine E ( $\alpha$ -Tocophérol) :

La vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols. Ils existent 8 dérivés dont l'alfa-tocophérol est le plus abondant (Shils et al, 2006). La vitamine E a une capacité antioxydante élevée, elle joue un rôle biologique fondamental dans la protection des cellules et des tissus contre les dommages oxydatifs, ainsi que dans la peroxydation des lipides membranaires et des lipoprotéines (Claycombe *et al.*, 2001 ; Baudin, 2006 ; Gokcimen *et al.*, 2007). Particulièrement, elle protège les membranes mitochondriales, riches en acides gras polyinsaturés qui sont une cible importante du stress oxydatif (Mohamed *et al.*, 2015 ; Morris et Carson, 2003; Shils et al, 2006; Traber et Atkinson, 2007). Cette action est catalysée par

l'hydrogénation de leur radical hydroxyle (ROO•) et alkoxy (RO•), empêchant ainsi la peroxydation lipidique (Chabory, 2009; Magosso *et al.*, 2013 ; Ambrogini *et al.*, 2016). Par conséquent, la vitamine E pourrait renforcer la résistance à la chimiothérapie, en tant qu'agent bénéfique, il a été démontré que la vitamine E allonge la durée de vie des animaux de laboratoire et diminue la perte de poids provoquée par la chimiothérapie (Granados-Principal *et al.*, 2010).

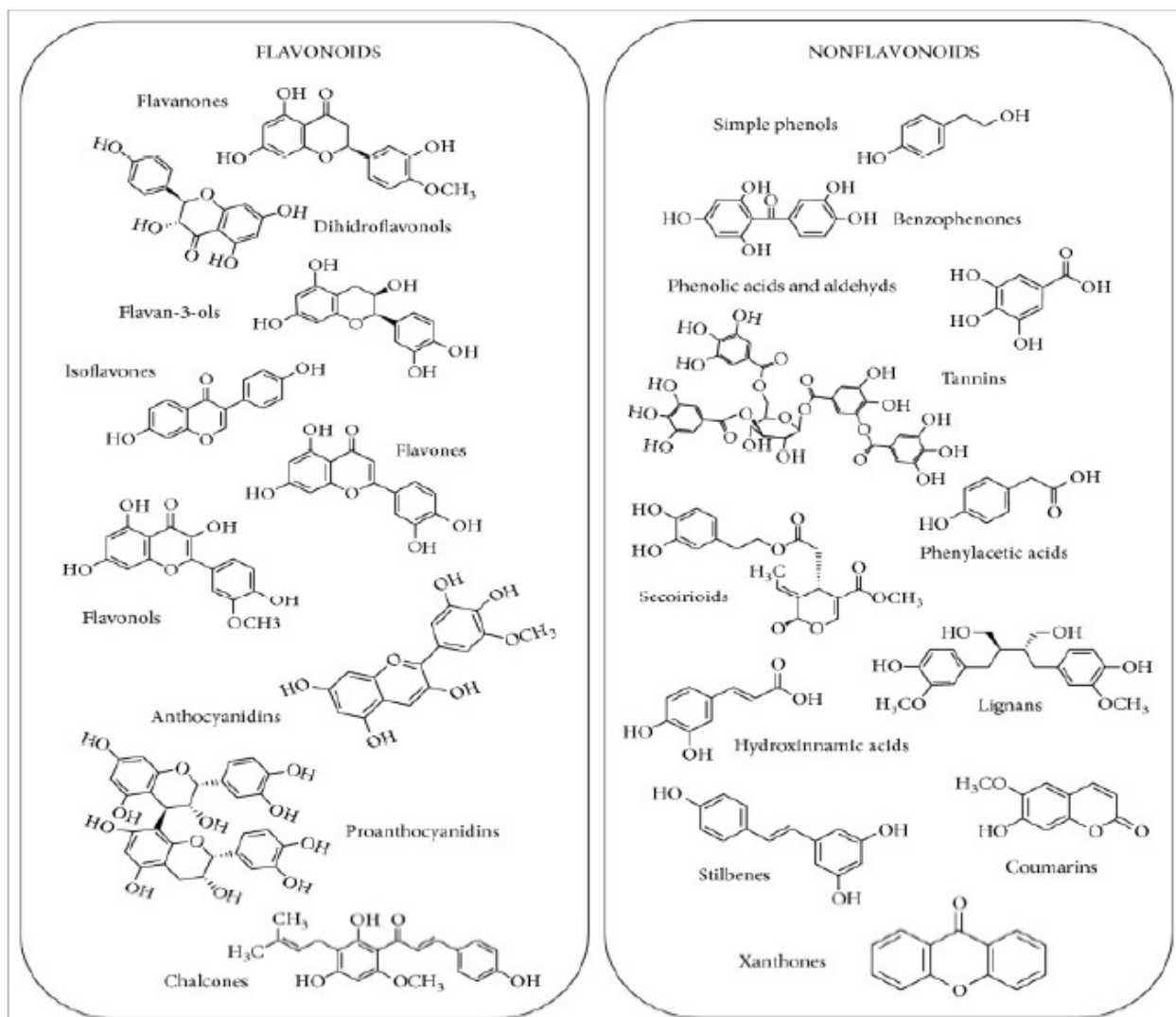
### 5.2.3. La vitamine C (Acide ascorbique):

La vitamine C ou acide L-ascorbique est un antioxydant hydrosoluble efficace contre la peroxydation lipidique, elle a une capacité à piéger les ROS dans la fraction aqueuse avant que ces molécules ne puissent donner lieu à des dommages lipidiques (Chen *et al.*, 2017). Cependant, il a été rapporté que la vitamine C peut allonger la durée de vie des animaux de laboratoire et réduire les effets toxiques de la DOX (Granados-Principal *et al.*, 2010). La vitamine C à des doses trop élevées et dans le processus de défense immunitaire, peut exercer une action pro-oxydante en réduisant l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ) qui est un puissant catalyseur de plusieurs réactions redox comme la réaction de Fenton/Haber-Weiss (Sayre *et al.*, 2005 ; Mac Laren, 2007; Duarte *et al.*, 2007). En augmentant la disponibilité du fer ferreux, la vitamine C pourrait favoriser les dommages causés à l'ADN (Duarte *et al.*, 2007) et paradoxalement stimuler la réparation de l'ADN oxydé (Duarte *et al.*, 2009).

### 5.2.4. Les polyphénols:

Les polyphénols sont des antioxydants naturels de structures variées, très utilisés en phytothérapie (Saija *et al.*, 1995; Hennebelle *et al.*, 2004). Ils sont largement distribués dans les plantes alimentaires et médicinales et possèdent un large spectre d'activités biologiques, notamment des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumorales (Middleton *et al.*, 2000), vasodilatrices, anti-athérosclérose, antivirales, antimicrobiennes et anticancéreuses (Narayana *et al.*, 2001 ; Seyoum *et al.*, 2006). En effet, les propriétés antioxydantes des polyphénols font l'objet de la recherche scientifique. Depuis longtemps, plusieurs études suggèrent que les polyphénols jouent un rôle crucial contre le développement de différentes maladies, notamment les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies neuro-dégénératives (Baharun, 1997 ; Pandey *et al.*, 2009). Les polyphénols sont classés selon leur structure chimique de base en flavonoïdes et non flavonoïdes (Sanchez-moreno, 2002) (Fig.22). Les flavonols, les flavones, les anthocyanes, les flavanones et les isoflavones sont les classes les plus importantes de flavonoïdes. Les non-flavonoïdes

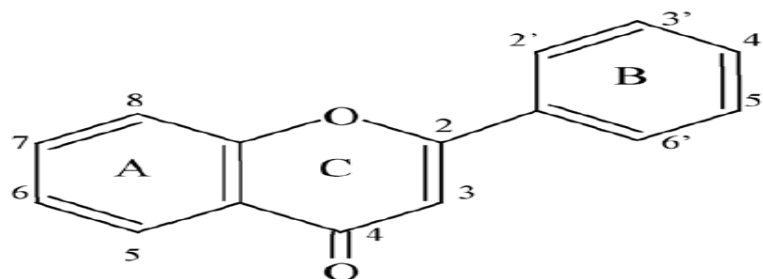
regroupent principalement les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffmann, 2003 ; Mattera *et al.*, 2017).



**Figure 22:** Structures chimiques représentatives des principaux groupes de polyphénols (Mattera *et al.*, 2017).

- **Les flavonoïdes :**

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux cycles aromatiques en C 6 (cycle A et cycle B), relié par un hétérocycle en C 3 (cycle C) (Bruneton, 1999 ; Pietta, 2000) (Fig.23).



**Figure 23:** Structure de base des flavonoïdes (Cushnie et Lamb, 2005).

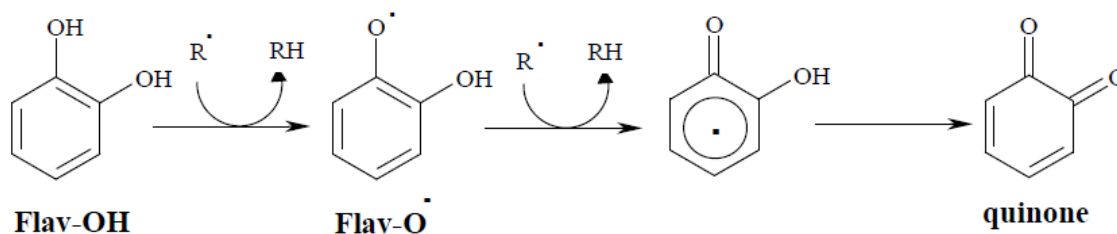
Les flavonoïdes (*flavus*, jaune en latin) (Ribereau-gayon, 1968), représentent une large gamme de composés naturels, appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum *et al.*, 2006), considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de la couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005). On estime que la prise moyenne des flavonoïdes par l'homme s'étend de 25 mg à 1 g/jour (Wang et Mazza, 2002). De nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des végétaux, en attirant ainsi les insectes vers le nectar et en assurant le transport du pollen (Yoshikawa *et al.*, 1994). Certains flavonoïdes par leur goût désagréable, protègent les plantes en repoussant certains insectes. D'autres, jouent également un rôle dans la lutte contre les infections provoquées par les champignons et les bactéries (Hrazdina *et al.*, 1976). De plus, ils sont impliqués dans la photosensibilisation, la morphogénèse, la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Medjroubi *et al.*, 2003).

#### ✓ Activités antioxydantes des flavonoïdes :

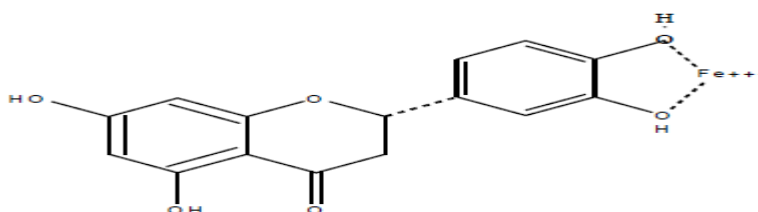
L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante des flavonoïdes, ce mécanisme est lié à la structure et à l'arrangement des groupements hydroxyles des flavonoïdes (Sokol-Letowska *et al.*, 2007). Des études qui ont été consacrées pour élucider la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, ont montré que ces composés possèdent une structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons. La double liaison entre C 2 -C 3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C 2 -C 3, confèrent aux flavonoïdes une capacité à piéger les radicaux libres. À cause de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes (Flav-OH)

sont thermodynamiquement capables de réduire les ROS comme le radical  $\text{OH}^\bullet$  et  $\text{O}_2^\bullet$ , les radicaux peroxy et alkoxy par transfert d'hydrogène. Le radical aloxyle résultant ( $\text{Flav-O}^\bullet$ ) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Javanovic *et al.*, 1994) (Fig.24).



**Figure 24:** Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Pietta, 2000)

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques responsables de la production de radical hydroxyle (Fe et Cu), les sites potentiels pour la chélation de ces ions métalliques sont; le noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C et les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000 ; Heim *et al.*, 2002 ; Marfak, 2003 ; Lhuillier, 2007) (Fig.25).



**Figure 25:** Exemple de chélation du fer par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont connus pour inhiber des enzymes intervenant dans divers mécanismes biologiques, notamment celles qui sont impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases et les monooxygénases microsomiales (Lhuillier, 2007). Ils inhibent également l'histidine décarboxylase, l'élastase, l'hyaluronidase, ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire ; ils bloquent aussi d'une manière non spécifique l'activité de la catéchol-O-méthyl-transférase, ce qui augmenterait la quantité de la catécholamine disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire. En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiésterase de l'AMPC, ce qui pourrait expliquer leur activité en tant qu'antiagrégant plaquettaire, ils inhibent également l'aldose



réductase qui est impliquée dans la pathogénie de la cataracte (Bruneton, 1999). Par ailleurs, les flavonoïdes peuvent inhiber la promotion de la tumeur en bloquant l'activité de la phosphoxylase C et la protéine kinase (Formica et Regelson, 1995 ; Kao *et al.*, 2007).

#### **6. Protection des antioxidant contre les dommages testiculaires induits par la DOX**

Diverses études ont proposé des mesures de protection contre les dommages testiculaires induits par laDOX en utilisant des composés principalement constitués d'antioxydants d'origine végétale ou chimique. Le principal mécanisme par lequel ces composés atténuent la toxicité des spermatozoïdes induite par la DOX est leur rôle dans l'amélioration du stress oxydatif. Le tableau 2 présente une liste d'agents naturels ayant déjà démontré des effets protecteurs contre la toxicité des testicules induite par la DOX.

**Tableau 2:** L'activité de quelques antioxydants vis-à-vis des dommages testiculaires induits par la DOX

Référence	modèle	Dose (DOX)	Effets toxiques de la DOX Au niveau des testicules	Type des agents antioxydant	Dose (Agent)	Résultats du Co-traitement Dox+ Antioxydant
(Nowrouzi <i>et al.</i> , 2019).	souris/in vivo	9 mg/kg i.p	Réduction de la spermatogenèse ↑Stress oxydatif, ↑apoptose cellulaire -Perte massive des cellules germinales ↓Poids testiculaire et corporel ↑Pourcentage des tubes séminifères touchés ↓Nombre de couches cellulaires ↓Densité de l'épithélium séminifère ↓Taux des cellules de sertoli, suppression de la spermatogenèse ↓Nombre, ↓viabilité, ↓motilité des spermatozoïdes	<b>Extrait de <i>Rosa canina</i></b> (Rosacées)	100-200 mg/kg i.p	↓Stress oxydatif ↓Infertilité masculine -progression du processus méiotique -Amélioration des paramètres histopathologiques ↓Pertes des cellules germinales ↑Niveau de la testostérone ↑Nombre, ↑viabilité, ↑mobilité des spermatozoïdes
(Eleiwa <i>et al.</i> , 2018)	Rats/in vivo	<b>3 mg/ kg i.p</b>	↓CAT, ↓GPx, ↓SOD ↑Peroxydation lipidique, ↑MDA -Induction du Stress oxydatif testiculaire -Perturbation du contrôle de rétroaction négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire ↓Taux sérique de la testostérone, ↓LH, ↓FSH -Détérioration de la spermatogenèse ↓Nombre et mobilité de spermatozoïdes ↑Signes d'anomalie du sperme -Détérioration du tissu testiculaire -Arrêt de la spermatogenèse ↑Nombre de spermatozoïdes morts, immobiles et anormaux	<b><i>Spirulina platensis</i></b> : (microalgue photosynthétique)	300 mg/kg Voie orale	-Amélioration du statut antioxydant ↑CAT, ↑GPx, ↑SOD -Inhibition directe de la Peroxydation lipidique, ↓MDA -Piégeage des radicaux libres -Amélioration de la fonction des cellules de l'hypophyse antérieure ↑Taux sérique de la testostérone, ↑LH, ↑FSH -Amélioration de la spermatogenèse et des paramètres du sperme ↑Nombre de spermatozoïdes ↓Signes d'anomalies du sperme
(Kopalli <i>et al.</i> , 2016)	Rats/in vivo	<b>1 mg/kg i.p</b>	↓Pourcentage, diamètre des tubes séminifères ↓Taux du sperme -Histologie mal conservée ↓Nombre, viabilité et motilité des spermatozoïdes ↓Poids des testicules et de l'épididyme Perturbation des cellules de sertoli ↓Niveaux hormonaux sériques du sexe, LH, FSH	<b>Extrait aqueux de Ginseng rouge coréen (KRG-WE)</b>	100-200 mg/kg Par voie orale	↑Pourcentages des tubes séminifères ↑Nombre de spermatozoïdes -Maintien du développement et de la différenciation des spermatozoïdes -Régulation des niveaux hormonaux sériques du sexe -Régulation du niveau des molécules biomarqueurs responsables de la production et du fonctionnement

			<p>Expression des récepteurs hormonaux sexuels :FSH-R, LH-R, AR</p> <p>Altération de la spermatogenèse</p> <p>Suppressions de l'expression de la néctine-2 (<math>\alpha</math> et <math>\beta</math>), l'inhibine (<math>\alpha</math> et <math>\beta</math>) et de CREB</p> <p>Génération des radicaux libres</p> <p>Désactivation des enzymes antioxydantes GSH, SOD, GPx, CAT</p> <p>Stress oxydatif testiculaire</p>			<p>du sperme</p> <p>-Régulation des facteurs de transcription clés</p> <p>Restauration de la transduction du signal impliqué dans la spermatogenèse</p> <p>-Balayage des radicaux libres</p> <p>-Amélioration du statut antioxydant enzymatique et non enzymatique</p>
(Yeh <i>et al.</i> , 2009)	Rat/in vivo	3 mg/kg i.p	<p>↑Lésions et dépolariation des mitochondries</p> <p>↑ROS, ↑peroxydation lipidique, ↑stress oxydatif</p> <p>↑MDA</p> <p>-Désactivation des enzymes anti-oxydantes</p> <p>↑Dommage à l'ADN</p> <p>↑P53, ↑Apaf-1, voie de signalisation apoptotique intrinsèque</p> <p>↑risque de tumorigenèse</p> <p>-Activation partielle de la voie apoptotique extrinsèque, TNFR-1, TRAIL-1, Caspase-8, clivage de Bid (tBid)</p>	<b>Extrait de <i>Ginkgo biloba</i></b>	5 mg/kg Par gavage	<p>-Améliore le sang pénien et l'impuissance masculine</p> <p>-Module certaines substances vasoactives, notamment le NO, les prostaglandines et le facteur d'activation des plaquettes</p> <p>-Suppression de la peroxydation lipidique</p> <p>-Protection de l'activité des enzymes anti-oxydantes défensives, en neutralisant l'action désactivatrice exercée par la DOX</p> <p>-Elimination des RL, réduction du niveau des ROS, inhibition du stress, suppression de l'apoptose et sauvetage des cellules germinales</p>
(Xin <i>et al.</i> , 2012).	Rats/ in vivo	10 mg/kg Injection intraveineuse	<p>↓Poids testiculaire et corporel</p> <p>↓Nombre de spermatozoïdes</p> <p>↓Concentration des spermatozoïdes mobiles</p> <p>↓Taux des spermatozoïdes anormaux</p> <p>↑Stress oxydatif, ↑peroxydation lipidique, ↑MDA</p> <p>-Dépolarisation mitochondriale, ↑Apoptose</p> <p>↑Anomalies du sperme</p> <p>↓Activité des enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique testiculaire</p> <p>↓ATP, ↓mobilité des spermatozoïdes</p> <p>↓Taux de la testostérone</p> <p>-Atteinte de la fonction testiculaire</p>	<b>Les polysaccharides de <i>Lycium barbarum</i> (LBP)</b>	200 mg/kg p.o	<p>-soulagement des lésions testiculaires</p> <p>-Atténuation du stress oxydatif</p> <p>-Normalisation des paramètres du stress</p> <p>-Piégeage des radicaux libres</p> <p>↓Peroxydation lipidique, ↓MDA, ↓NO</p> <p>Activation des enzymes antioxydantes</p> <p>↑Taux de la testostérone</p> <p>↑Pourcentage des tubes séminifères</p>
(Shalizar Jalali etHasanzade	Rat/in vivo	4mg/kg i.paux jours 1,	<p>↓Nombre des cellules germinales</p> <p>↓Poids corporel et testiculaire</p> <p>↓Androgènes</p>	<b><i>Crataegus monogyna</i> (extrait aqueux</b>	20 mg/kg Oralement pendant 28	<p>-Atténuation des dommages testiculaires</p> <p>↓ROS, ↓peroxydation lipidique, ↓stress oxydatif</p> <p>-Amélioration de l'activité des enzymes</p>

h , 2013)		7, 14, 21 et 28 (dose cumulée de 20 mg / kg)	<p>↓Spermatogenèse, ↓nombre de spermatozoïdes          ↑ROS, ↑peroxydation lipidique, ↑Stress oxydatif          -Altération des cellules de Leydig, ↓Testostérone, ↑LH, ↑FSH, défaillance de la spermatogenèse          -Altération des cellules de sertoli, ↓sécrétion de l'inhibine          -Altération du métabolisme énergétique, ↓ATP, ↓mobilité des spermatozoïdes          ↑Spermatozoïdes anormaux          ↑LDH, ↑CPK, ↑SGOT          -Vacuolisation, accumulation du liquide œdémateux          -Insuffisance testiculaire, infertilité masculine</p>	<b>de fruits)</b>	jours	<p>antioxydantes          -Augmentation significative du poids corporel, testiculaire et des glandes accessoires          -Amélioration de la qualité du sperme          ↓LDH, ↓CPK, ↓SGOT          ↑Testostérone          ↓LH, ↓FSH          -Restauration des changements morphologiques vers la normalité</p>
(Olusoji <i>et al.</i> , 2016)	Rat/in vivo	15 mg/kg i.p	<p>↑stress oxydatif          ↑ROS, ↑H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,          ↑Dommage à l'ADN et protéines          ↑Peroxydation lipidique, MDA          ↑NO, ↑stress nitrosatif          ↓GSH, GPx, SOD, CAT          ↓Rapport vie/mort des spermatozoïdes          ↓Spermatogenèse          ↓Nombre et mobilité des spermatozoïdes          ↑Anomalies : tête sans queue, partie médiane enroulée, queue sans tête, pièce médiane abaxiale, queue enroulée...          ↑Expression de l'ARNm de la prolactine, ↑prolactine, ↑ prolactinémie, ↓testostérone          ↓Stéroïdogénèse, ↓androgénogenèse          ↑Caspase-3, apoptose accrue</p>	<b>Acide Gallique</b>	60-120 mg/kg Oralement	<p>↓ROS, ↓H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ↓MDA,          ↑SOD, GPx, GSH, CAT          ↓stress oxydatif          ↓NO, ↓ stress nitrosatif          ↑Spermatogenèse          ↑Rapport vie/mort de spermatozoïdes          ↓Caspase-3, ↓apoptose</p>
(Ateşşahin <i>et al.</i> , 2006)	Rat/in vivo	10 mg/kg i.p	<p>↓Poids testiculaire &amp; épидидymaire          Atrophie parenchymateuse          ↑H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ↑ peroxydation lipidique, ↑mort cellulaire          ↑ROS, ↑stress oxydatif          ↓Spermatogenèse          Perte de la mobilité des spermatozoïdes          ↓Capacité fécondante et qualité du sperme          ↑Dommage à l'ADN du noyau spermatique et</p>	<b>Lycopène (caroténoïdes)</b>	4 mg/kg Par gavage Pendant 10 jours	<p>-piégeage des RL          ↓ROS, ↓H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ↓MDA,          ↑SOD, GPx, GSH, CAT          ↓stress oxydatif          ↑Spermatogenèse          Amélioration de l'affaiblissement des cellules de Leydig          -Protection in vivo contre l'oxydation des</p>

			des protéines ↓GSH, GPx, SOD, CAT et GST ↓NADPH, ↓GSSG/GSH Altération des cellules Leydig, ↓testostérone Stérilité prolongée (oligozoospermie)			biomolécules -normalisation des taux de sperme et sa qualité -Amélioration de la fertilité masculine
(Haghi-Aminjan <i>et al.</i> , 2018)	Rat/in vivo	3 mg/kg i.p	↓Poids corporel & testiculaire ↓Spermatogenèse, nombre de spermatozoïdes ↑Sérum CK-MB, LDH, GOT ↓Testostérone sérique ↑LPO, ↓GSH, ↓SOD, ↓CAT, ↓Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase, ↓Mg <sup>2+</sup> ATPase ↓Vacuolisation et débris fibrinoïd des ↓Nombre des cellules germinales dans les tubes séminifères ↑Elargissement de l'espace interstitiel	<b>Mélatonine</b>	6 mg/kg Par p.o	-↑poids corporel et maturation testiculaire -↑nombre des spermatozoïdes -↓CK-MB, LDH, GOT sériques -↑testostérone sérique, ↓LPO -↑GSH, SOD et CAT, ↑Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase, ↑Ca <sup>2+</sup> ATPase et ↑Mg <sup>2+</sup> ATPase Maintien de l'homéostasie mitochondriale -↓Vacuolisation et débris fibrinoïd -↓nombre des cellules germinales dans les tubes séminifères -↓Elargissement de l'espace interstitiel et vacuolisation dans les tissus interstitiels -effet anti apoptotique par l'inhibition des MPT limitant ainsi la libération des facteurs apoptotique/ Cyt c, SMAC/DIABLO, l'endonucléase G, Ca <sup>2+</sup> Réduction des niveaux de NO Amélioration de la qualité de la fonction de reproduction
(Türedi <i>et al.</i> , 2015)	Rat/in vivo	10 mg/kg i.p	↓Poids corporel & testiculaire ↓Spermatogenèse, nombre de spermatozoïdes, mobilité des spermatozoïdes ↑Taux de sperme anormal ↑anomalies Oligospermie dans l'épididyme et une azoospermie ↓Diamètre de l'épithélium germinale et la membrane basale des tubes séminifères ↓Testostérone ↑ dégénérescence des cellules germinales et vacuolisation ↑gonadotrophine	<b>Resveratrol</b> (polyphénol de la classe des stilbènes)	20 mg/kg i.p	Amélioration du poids et morphologie testiculaire ROS, peroxydation lipidique ↓MDA ↑GPx, ↑GSH ↑ taux de la Testostérone ↓Dégénérescence des cellules germinales ↑Gonadotrophines Amélioration de la spermatogenèse ↑Nombre de spermatozoïdes ↑Maturation des spermatozoïdes ↓Cassures de l'ADN des noyaux spermatiques ↓Apoptose des cellules

			<p>↑GSH, ↑GPx          ↓SOD, ↓CAT          ↑ROS, ↑peroxydation lipidique, ↑MDA          ↑Stress oxydatif, mort cellulaire          Fragmentation de l'ADN et lésions chromosomiques          ↓G6PD          Perturbation de la spermatogénèse</p>			<p>↓Spermatozoïdes anormaux</p>
(Çeribaşı <i>et al.</i> , 2012)	Rat/in vivo	2 mg/kg i.p	<p>↑Nécrose des cellules germinales          -Atrophie dans les tubes séminifères          ↓Dégénérescence          -Desquamation des cellules germinales          -vacuolisation des cellules de Sertoli          -Œdème interstitiel et congestion capillaire          -Hyperplasie des cellules de Leydig          ↓Testostérone          ↓Poids des vésicules séminales et de la prostate          ↓DST, ↓GCLT          -Blocage de la spermatogénèse          -Arrêt de maturation significatif          ↓Nombre et mobilité des spermatozoïdes          ↑spermatozoïdes anormaux          -mauvaise qualité du sperme          -Altération de l'équilibre oxydant/antioxydant          ↑ROS, peroxydation lipidique, stress oxydatif          ↑MDA, ↓GSH, ↓GPx, ↓SOD, ↓CAT          ↓NADPH, GSSG/GSH          Interconnexions directes d'ADN          Blocage du cycle cellulaire en phase G2          Bcl-2, apoptose</p>	<b>Acide ellagique</b>	2 mg/kg Par gavage	<p>-Normalisation Poids des organes reproducteurs          -Amélioration de l'architecture des testicules, ↑DST, ↑GCLT          -empêche la propagation des cellules cancéreuse          ↑testostérone          -Amélioration de l'équilibre oxydant/antioxydant          -Piégeage des RL          ↓MDA, ↑GST, ↑GSH, ↑SOD, ↑GPx, ↑CAT          ↓ROS, ↓Stress oxydatif          ↑Bax, ↓débit cellulaire apoptotique</p>
(Trivedi, Tripathi, 2011)	Rat/in vivo	4mg/kg i.p	<p>-Détérioration du mouvement et de la teneur en spermatozoïdes          -Effets néfastes sur la fertilité masculine          -Altération de la spermatogénèse, nombre des spermatozoïdes, des spermatocytes et des spermatides          ↑ROS, ↑peroxydation lipidique, ↑MDA, ↓GSH,</p>	<b>Hespéridine</b> (bi flavonoïde)	20, 50 et 100 mg/kg p.o	<p>-Amélioration de la spermatogénèse          ↑Nombre des spermatozoïdes          ↓ROS, ↓Stress oxydatif          Suppression du facteur NF-kB, de P38 et de Caspase-3          ↓Apoptose          Modulation de la voie du facteur NF-KB par le biais</p>

			<p>↑Stress oxydatif ↑NF-kB, ↑ P38, ↑P53, ↑Caspase-3, ↓Bcl-2, ↑Apoptose ↑Anomalies dans la morphologie de la tete des spermatozoïdes Désorganisation accrue dans la section testiculaire et Vacuolisation Tubes séminifères dépourvus de la structure cellulaire interne Œdème de l'épithélium et l'épididyme</p>			<p>de quatre voies de transduction du signal : NIK/Ikk, ERK, P38 et JNK ↓Anomalies</p>
--	--	--	--	--	--	--

### III- *Crataegus* sp:

#### 1. Description botanique de la plante :

L'aubépine, un nom commun pour toutes les espèces végétales du genre *Crataegus* (Chang *et al.*, 2002) (Fig.26), elle appartient à la famille des Rosacées (Bruneton, 1993 ; Guermontprez *et al.*, 1997 ; Fikret Balta *et al.*, 2006 ; Poitevin, 2014), qui contient de 150 à 1200 espèces (Talent *et al.*, 2005 ; Nieto-Angel *et al.*, 2013). Actuellement, plus de 20 espèces d'aubépines sont utilisées comme médicaments à base de plantes ou drogue végétale dans le monde. Certaines d'entre elles sont officiellement inscrites dans les pharmacopées de nombreux pays comme la Chine, l'Allemagne, La France et l'Angleterre. Le genre *Crataegus* est un groupe complexe d'arbres et d'arbustes épineux ou petits arbres à feuilles vertes brillantes, fleurs blanches et des baies rouge vif chacune contenant une à trois ou cinq graines, selon l'espèce (Hobbs *et al.*, 1990 ; Leung *et al.*, 1996; Poitevin, 2014). Cette plante est exceptionnellement annuelle, elle se trouve un peu partout dans le monde mais d'une façon prépondérante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord (Shalizar Jalali *et al.*, 2011). En Algérie, elle est connue dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien (Bouزيد, 2008). *Crataegus* tient son étymologie du latin « *Kratos* », qui signifie la branche dure par allusion à la dureté de cet arbrisseau (Nieto-Angel *et al.*, 2013). Comme pour tous les composés, son tronc de bois dur grisâtre est revêtu d'une écorce lisse, et les branches sont glabres portants des épines robustes et droites (Kremer, 2011). Leurs feuilles sont caduques, alterne et de couleur vert vif luisant à leur face supérieure et plus clair à la face inférieure (Orhan, 2018). Les fleurs de l'aubépine, au parfum subtil, petites, possèdent un style et sont blanches, rosées ou groupées en corymbes. Ces fleurs ont été utilisées en Algérie en usage interne, comme antispasmodiques et cardiotoniques, et au Maroc ont été employés sous forme d'un remède contre les palpitations et les diarrhées (Mohand, 2006). Plusieurs types de fruits sont retrouvés : akènes, drupes samares, qui sont simples ou multiples renfermant un endocarpe, un péricarpe, une graine de tailles variées ou se trouve un embryon de tailles différentes.





*Crataegus Azarolus*



*Crataegus oxycantha*



*Crataegus Crus-galli*



*Crataegus coccinea*



*Crataegus rhipidophylla*

**Figure 24:** différentes espèces du genre *Crataegus* (www.wikipedia.org)

## 2. Noms vernaculaires :

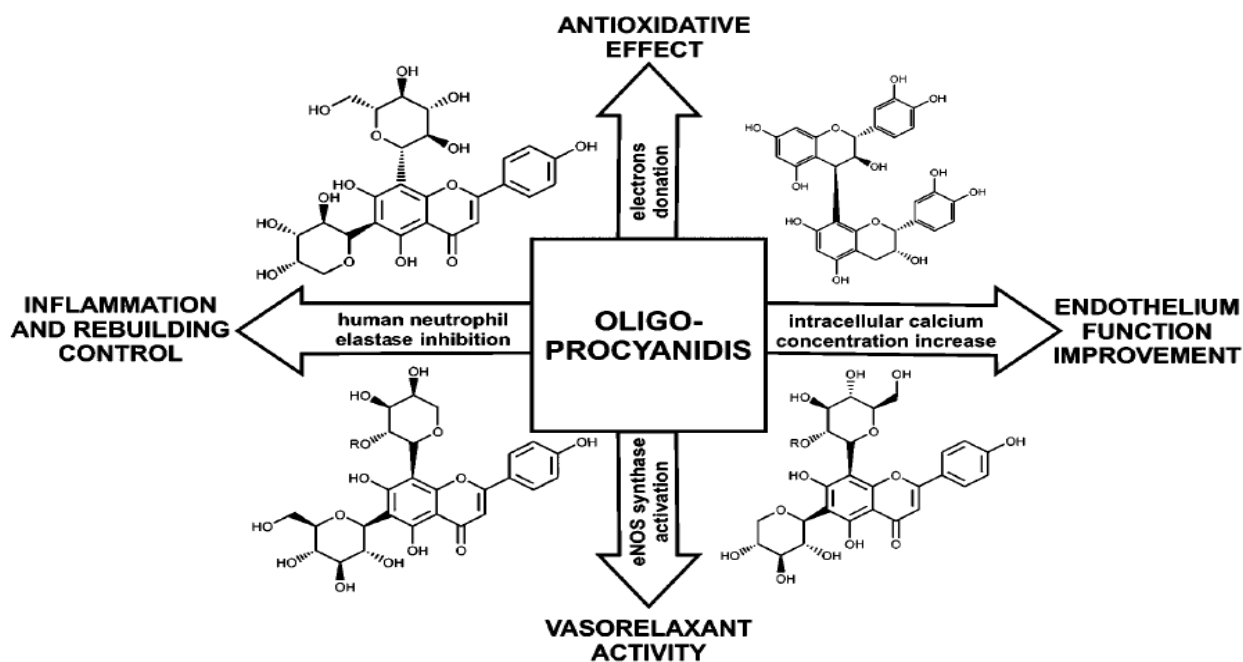
L'espèce *Crataegus* sp est répandue un peu partout dans le monde, sa nomenclature se diffère selon sa région. En arabe elle est connue sous le nom de Baba adjina, Boumekherri, Ain baquera ou Zaaror (Djerroumi et Nacef, 2004). Chez les berbères elle est nommée Admamai, Allmène, ou Idmine (Beloued, 2012). Les Anglais utilisent les appellations de: hawthorn, haws, may bush, may bolossom, white thorn, hawthorn midland (Verma *et al.*, 2007). En France cette espèce est appelée Aubépine des haies, épine blanche ou albinspine (Bézanger et Pinkas, 2014).

**3. Classification taxonomique de l'espèce *Crataegus sp* :**

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous- Classe	Rosidae
Ordre	Rosales
Famille	Rosaceae
Sous- Famille	Maloideae
Genre	<i>Crataegus</i>
Espèce	<i>Crataegus sp</i>

**4. Intérêt biologique de l'espèce *Crataegus sp* :**

Les aubépines ont une large liste d'utilisation en médecine traditionnelle chinoise et européenne (Zhongguo, 1984), leurs fruits sont utilisés pour stimuler la digestion et la fonction de l'estomac et l'amélioration de la circulation sanguine. Les aubépines exercent plusieurs activités pharmacologiques, telles qu'hypertenseur (Abdul-Ghani *et al.*, 1988), anti-hyperlipidémique (Shanthi *et al.*, 1994), anti-hyperglycémiantes (Jouad *et al.*, 2003), anxiolytiques (Della Loggia *et al.*, 1983), immun-modulatrices (Hanus *et al.*, 2004 ; Elango *et al.*, 2010 ) et antimutagènes (Dirican et Türkez, 2012). L'intérêt de ce genre des plantes réside dans le fait qu'elles sont riches en composés phénoliques, *Crataegus sp* contient un pourcentage important des amines (phénétylamine, tyramine) à action inotrope positive, des flavones (hétérosides de la quercétine) et des flavannes à effet coronarodilatateur, inotrope positif et hypotenseur. Les *Crataegus sp* sont riches en Vitamine C, en glycosides, en saponines, en tanines, en proanthocyanidines (variant entre 1 et 3% dans les fruits ou les feuilles avec des fleurs), et en flavonoïdes (entre 0.1 et 1% dans les fruits et 1 à 2% dans les feuilles et les fleurs) (Schussler et Holzl, 1995 ; Bahorun, 1997; Chang *et al.*, 2002 ; Ljubuncic *et al.*, 2005 ; Fikret Balta *et al.*, 2006 ; Shalizar Jalali et Hasanzadeh, 2013 ), Ces constituants biologiquement actifs, sont les principaux métabolites secondaires observés dans cette espèce qui sont responsables de son activité antioxydants (Orhan, 2018). (Bahorun *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2001; Rice-Evans, 2004) (Fig.27).



**Figure 27:** Les différents effets des composés majeurs du genre *Crataegus* (Zorniak *et al.*, 2017)

### 5. Effet chimio-protecteur de genre *Crataegus* vis-à-vis de la toxicité testiculaire induite par la DOX :

Des études ont montré que les extraits de *Crataegus monogyna* (provenant de plusieurs parties de la plante, y compris les fruits), sont riches en pro- anthocyanidines et en flavonoïdes (Shalizar Jalali et Hasanzadeh, 2013). Ce bon nombre des composés phénoliques prouve l'action cytoprotectrice hautement significative de cette plante et sa valeur thérapeutique en clinique. Cette espèce de plante sert d'agent protecteur contre la toxicité du système reproducteur induite par la DOX (Tableau 3). Shalizar Jalali et Hasanzadeh, 2013 ont montré que l'extrait aqueux des fruits de cette plante pourrait prévenir efficacement les effets indésirables de la DOX (diminution significative du poids du corps et des organes et des activités spermatogènes, ainsi que de nombreuses altérations histologiques, diminution significative du nombre de spermatozoïdes et de la motilité avec une augmentation du nombre de spermatozoïdes morts et anormaux, De plus, une diminution significative des taux sériques de testostérone et une augmentation des concentrations sériques de FSH, de LH, de LDH, de CPK et de SGOT) en inhibant efficacement les processus d'oxydation et en rétablissant le système de défense antioxydant (Tableau 3).

*Deuxième Partie :*  
**Partie Expérimentale**  
*In vitro et In vivo*

## **I. Matériels et méthodes :**

### **1. Matériel végétal :**

La plante a été collectée dans la région de la wilaya de Mila (Nord-est de l'Algérie) en septembre 2014, et identifiée par le professeur M. Kaabeche (Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie).

### **2. Préparation de l'extrait de plante :**

Les fruits récoltés ont été séchés à température ambiante dans un endroit aéré à l'abri de l'humidité et des rayons solaires. La matière végétale sèche (460 g) a été ensuite broyée et macérée dans l'éthanol 80% (1 L) à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, la macération a été répétée 2 autres fois sur le marc avec renouvellement du solvant. Les filtrats sont rassemblés, puis concentrés (non à sec) sous pression réduite à une température n'excédant pas 35°C. La solution obtenue (400 ml environ) a été dissoute dans 400 ml de l'eau distillée sous agitation magnétique et maintenue à 4°C pendant une nuit pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, la solution obtenue est soumise à des affrontements successifs à l'aide de solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole (1x300 ml), le chloroforme (3x300 ml), l'acétate d'éthyle (3x300 ml) et finalement le *n*-butanol (3x300 ml). Les quatre phases organiques ont été séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrées en utilisant un papier filtre commun et concentrées sous pression réduite (35°C environ) pour obtenir les extraits suivants : éther de pétrole, CHCl<sub>3</sub> (1,17 g), AcOEt (2,03) et *n*-BuOH (9,32 g).

### **3. Modèle expérimental *in vitro* :**

#### **3.1 Détermination des polyphénols totaux dans l'extrait :**

La teneur totale en phénols dans l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode décrite par Singleton et al. 1999. L'extrait *n*-butanol est solubilisé dans le méthanol (MeOH) à une concentration de 1 mg/ml. A chaque 20 µl de la solution de l'extrait préparé, 100 µl de Folin-Ciocalteu et 1580 µl d'eau distillée ont été ajoutés successivement. 3 minutes plus tard, on ajoute 300 µL d'une solution de carbonate de sodium 20 %. Après agitation et 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 mesurée à 765 nm. La concentration des composés phénoliques totaux dans l'extrait a été déterminée en µg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante :

Absorbance = 0.001 x [acide gallique]

### **3.2. Détermination de la teneur totale de l'extrait en flavonoïdes :**

La teneur total en flavonoïdes a été estimé selon la méthode décrite par Wang et al. 2008. A chaque 0,5 ml de l'extrait préparé dans le méthanol, 0,5 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% a été ajouté. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. La concentration totale des flavonoïdes a été calculée en µg d'équivalents de quercétine (QE) pour 1 mg de l'extrait à l'aide de l'équation suivante :

Absorbance = 0.034 x [quercétine (µg)] + 0.015

### **3.3. Evaluation du pouvoir antiradicalaire (DPPH) :**

Le DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui s'absorbe à 517 nm. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote, en présence des antioxydants il sera réduit. La réduction du radical DPPH 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 capacité de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus sp* à piéger le radical DPPH a été évaluée par une procédure décrite par Braca et al. 2001. Un volume de différentes concentrations de l'extrait est ajouté à 3 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,004 %) fraîchement préparée. Les essais ont été effectués en triple et les tubes ont été incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été ensuite mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'extrait (Bentabet *et al.*, 2014). Le pourcentage d'activité de piégeage de DPPH (I%) a été calculé selon l'équation suivante :

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

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

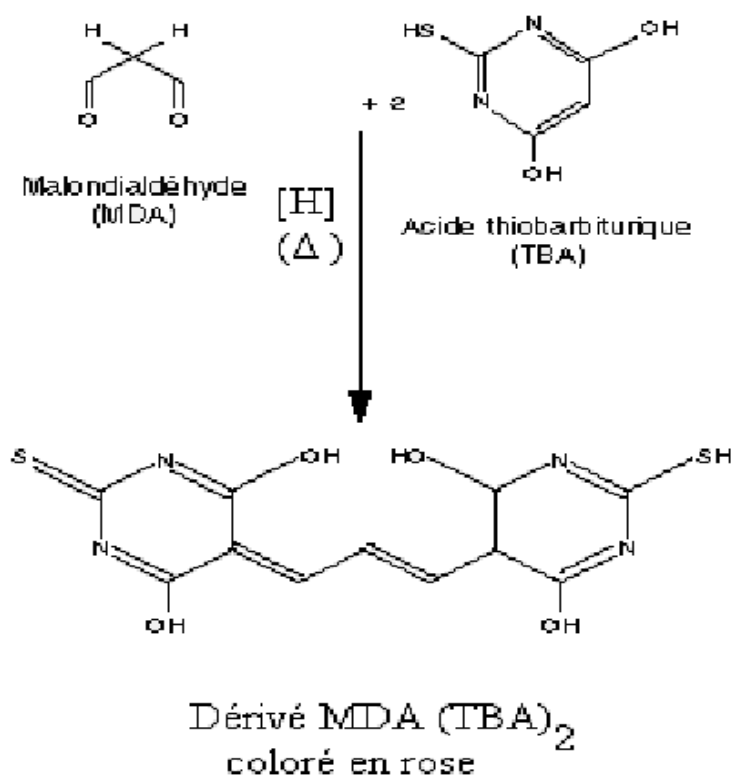
**A2:** absorbance en présence d'extrait.

### **3.4. Détermination des concentrations inhibitrice médianes « IC<sub>50</sub> » :**

Les concentrations inhibitrices médianes IC<sub>50</sub> permettent de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Les IC<sub>50</sub> ont été calculées graphiquement à partir des équations des courbes de tendances linéaires basées sur la variation du pourcentage de l'inhibition du radical DPPH (I%) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

### 3.5 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation lipidique dans le *vitellus* des œufs a été évaluée par le dosage de la concentration du MDA, qui est un indicateur fiable de la peroxydation lipidique, et ceci était selon la méthode décrite par Cao et Ikeda, 2009. En milieu acide et chaud (pH 2 à 3, 100°C), une molécule du MDA est condensée avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 532 nm).



**Figure 25:** Principe de dosage du Malondialdehyde

- Pour le dosage du MDA, 1 g de *vitellus* est additionné à 10 ml de solution de PBS (20mM, pH 7.4) puis homogénéisés.
- L'homogénat est centrifugé pendant 20 minutes à 4000 tours/minute et le surnageant obtenu est utilisé.
- A 0,5 ml de surnageant (l'homogénat 10%), différentes concentrations de l'extrait à tester (0,1 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/ml) et 50µl FeSO<sub>4</sub> (0.07 M) sont ajoutées.
- Le mélange a été ensuite incubé avec des concentrations croissantes de l'extrait à 37°C pendant une heure

- La réaction est stoppée par l'addition de 1ml d'acide trichloracétique (TCA20% w/v) et 1.5 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 1% respectivement.
- Les échantillons ont été mélangés, chauffés à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis il a été additionné 4 ml *de n*-butanol.
- Après centrifugation des échantillons pendant 20 minutes à 4000 tours/min, l'absorbance a été mesurée à 532nm.
- Les résultats du dosage sont exprimés en pourcentage d'inhibition.
- L'activité scavenger du lipide peroxydation (*K*, %) est calculé par l'équation suivante:  
$$K(\%) = [(Ac - As) / Ac] \times 100\%$$

*Ac* absorbance de control, *As* absorbance des échantillons testé

#### **4. Modèle expérimental *in vivo* :**

##### **4.1. Animaux et conditions d'hébergement :**

Dans cette étude expérimentale, les rats mâles adultes d'une souche *Wistar Albinos* (Institut Pasteur, Alger) pesant (200-250g), sont utilisés. Dès leur réception, Ils ont été groupés dans des cages standards pour une période d'acclimatation dans une température ambiante avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Pendant cette période, les rats sont maintenus dans une animalerie où il y avait un accès libre à la nourriture (croquettes riches en vitamines et nutriments provenant de la société de la production d'aliments des animaux, Bouzaréat, Alger) et à l'eau.

Notre étude a pour objectif d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol du *Crataegus sp* vis-à-vis de la toxicité induite par la DOX, notre expérience a été réalisée durant une période de 10 jours. Les rats ont été repartis en 5 lots de 7 rats, de la manière suivante :

- Groupe témoins (contrôle), non traité.
- Groupe DOX : reçoit le médicament par injection intrapéritoniale (ip) à la dose de (15 mg/kg).
- Groupe Ext: reçoit l'extrait de *Crataegus sp* par gavage à la dose de 75 mg/kg, dissous dans l'eau distillée, pendant 10 jours.
- Groupe Ext+ DOX : traité avec l'extrait par gavage (75mg/kg) et la doxorubicine par voie intrapéritoniale (Ext+DOX) le 8<sup>ème</sup> jour.
- Groupe Vit E : reçoit la vitamine E par gavage, une dose de 100 mg/kg dissous dans l'eau distillée pendant 10 jours et par la DOX (Vit E+DOX) le 8<sup>ème</sup> jour



## **4.2. Évaluation biochimique et mesure des paramètres de stress oxydatif:**

### **4.2.1. Dosage du MDA au niveau de l'homogénat :**

Le malondialdéhyde (MDA) est un marqueur fiable de la peroxydation lipidique, il a été mesuré à partir d'homogénats des testicules par le TBARS assay. Le dosage des TBARS (Thiobarbituricacidreactive substances) est basé sur la réaction du MDA avec le TBA (acide thiobarbiturique), sous conditions de haute température et d'acidité. Le complexe de couleur rose MDA-TBA formé a été mesuré par colorimétrie. Les homogénats des testicules ou du standard ont été ajoutés à la solution contenant le TBA (0.67%) et l'acide phosphorique (1%). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 45 min à 100 °C. Après l'incubation, les échantillons et les standards ont été refroidis pendant 10 min afin d'arrêter la réaction, et 4 ml de n-butanol ont été ajoutés. Puis, une centrifugation a été effectuée à 3000 rpm pendant 20 min. Ensuite, l'absorbance du surnageant soit mesurée à 532 nm et le niveau de MDA exprimé en nmol/g tissu.

### **4.2.2 Dosage de glutathion testiculaire**

Le dosage du glutathion testiculaire (GSH) est déterminé par la méthode colorimétrique d'Ellman, 1959. Son principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Pour ce dosage, le testicule est homogénéisé dans cinq volumes de TCA 5% puis centrifugé à 2000 rpm. 200 µl de surnageant sont dilués dans 1,8 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 8). À 2 ml du mélange de dilution, 100µl de DTNB (0.01M) sont additionnés. L'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont exprimées en n mol/gr de tissu.

### **4.2.2. Evaluation de l'activité enzymatique du Glutathion peroxydase (GPx)**

L'activité de la GPx est mesurée par la technique de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence du glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence du GP<sub>x</sub> selon la réaction suivante :



La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB). Le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit

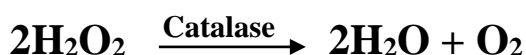
spontanément avec le DTNB et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) comme le montre la réaction suivante :



Pour un dosage spectrophotométrique, on mélange 200 $\mu$ l de l'homogénat des testicules, 200 $\mu$ l du tampon TBS (100mM), 400 $\mu$ l GSH (0,1 mM) et 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mM). On les incube ensuite pendant 5 min à 25°C, puis on ajoute 1 ml TCA 1 %. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 1500g. On récupère 480 $\mu$ l du surnageant et on lui ajoute 2.2 ml tampon phosphate et 320  $\mu$ l DTNB (1 mM). Ensuite on note l'absorbance mesuré après 5 min. Le dosage des protéines dans l'homogénat est réalisé par la méthode de Lowry, 1951.

#### **4.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique du Catalase (CAT) :**

L'activité de la catalase a été estimée selon la méthode de Claiborne, (1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) du fait de l'activité de la catalase présente dans l'échantillon selon la réaction suivante :



Un volume de 25  $\mu$ l de cytosol a été mélangé avec 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 975 $\mu$ l du peroxyde d'hydrogène (0.019 M). La densité optique a été mesurée trois fois successive chaque 60 secondes à 240 nm. L'activité de la catalase a été exprimée en unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon l'équation suivante :

$$\text{UI/g} = (2,3033/\text{T}) \times (\log \text{A1}/\text{A2}) / \text{g de protéine}$$

**A1** : Absorbance à la première minute.

**A2** : Absorbance à la deuxième minute.

**T** : Intervalle de temps en minute.

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

### **4.3. Etude histologique :**

Après le sacrifice des animaux et leur dissection, une perfusion aura lieu avec une solution froide de NaCl (0.9%) afin d'assurer une sorte de lavage et drainer tout le sang restant dans les organes. Les testicules sont immédiatement prélevés et conservés dans un fixateur (formol 10%) pour réaliser des coupes histologiques. Les organes conservés dans le formol sont transportés vers un laboratoire d'Anatomie pathologique, où ils seront enregistrés, identifiés et transcrits par le technicien sur les blocs et les lames qui seront examinés au microscope après traitement. Leur fixation est considérée comme une étape essentielle dans le but de s'opposer à l'autolyse et conserver les cellules et l'architecture tissulaire. Les organes sont ensuite fragmentés et traités par déshydratation d'une manière automatique à l'aide d'un automate en utilisant des bains d'éthanol. Les échantillons vont subir successivement trois bains de xylène (à la place de l'eau pour faciliter la pénétration de la paraffine qui est hydrophobe, pour éliminer les traces d'alcool et clarifier les tissus) et deux bains de paraffine fondus durant 24 heures. Les échantillons sont placés dans des barres de Leucart et recouverts de paraffine fondue et après refroidissement, les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 2 à 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. À l'aide d'une pince fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine où sont par suite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans les bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline pour colorer les noyaux, elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (8 min) pour colorer le cytoplasme en rose et les fibres dans une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'acidophile des différents éléments. Après coloration, il y aura un montage qui consiste à fixer à l'aide d'une substance appropriée (l'Eukit) une lamelle couvre-objet sur des préparations cytologiques ou histologiques. Les lames ainsi colorées sont prêtes à l'observation microscopique (Objectif  $\times 10$  et  $\times 40$ ).

Nos coupes histologiques ont été réalisées dans le laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Constantine, et la lecture des lames a été effectuée dans l'hôpital militaire avec des médecins anatomopathologistes.

### **4.4. Évaluation statistique**

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et d'écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test de Student.

## II. Résultats et Discussion

### II.1. Résultats et discussion de la partie expérimentale in vivo

#### 1. Rendements d'extraction et dosage des polyphénols totaux :

Les résultats de la présente étude ont montré que l'extrait *n*-butanol de *Crataegus sp* représente le rendement le plus élevé (2,02 %), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (0,44 %). Le rendement le plus faible est obtenu par l'extrait chloroformique (0,25 %) (Tableau 3).

**Tableau 3:** Rendement des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
Parties aériennes (460 g)	Chloroforme	1,17	0,25 %
	Acétate d'éthyle	2,03	0,44 %
	<i>n</i> -Butanol	9,32	2,02 %

#### • Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux

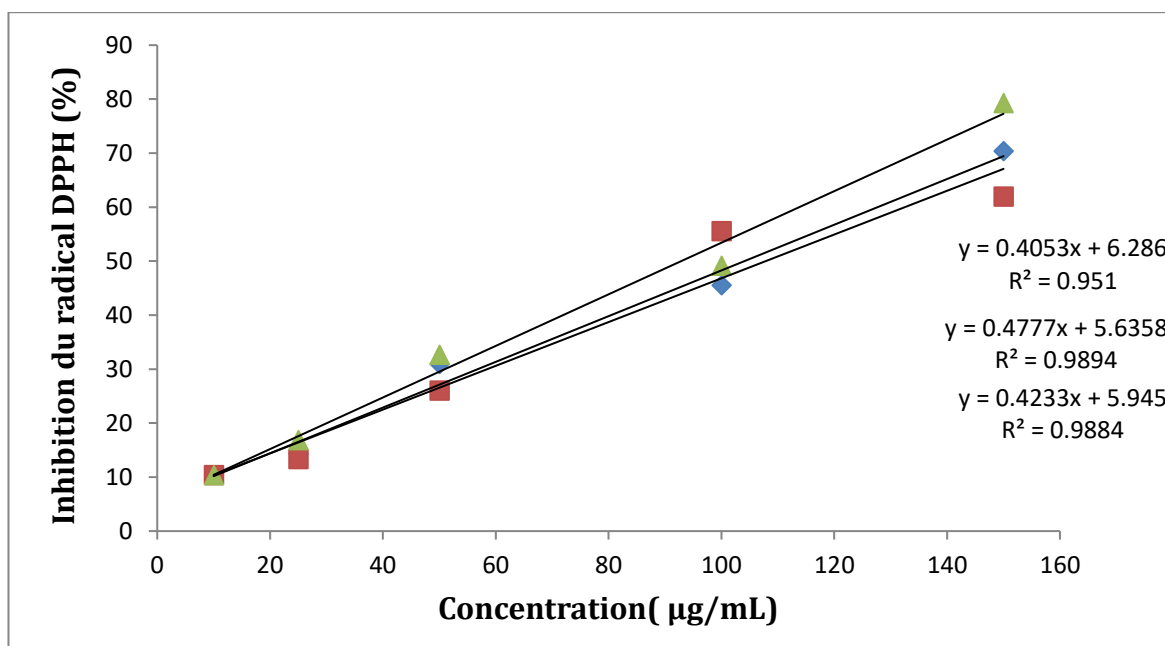
Les résultats obtenus montrent la richesse de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus sp* en polyphénols et en flavonoïdes, dont la teneur représente  $146,66 \pm 11,84 \mu\text{g}$  d'équivalents d'acide gallique/mg d'extrait et  $25,91 \pm 0,18 \mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine/mg d'extrait respectivement.

#### 2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire :

Le composé 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques (Bentabet *et al.*, 2014). L'activité antiradicalaire de la plante *Crataegus sp* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée dans l'extrait. Selon les résultats obtenus, l'extrait de la plante est doté d'un bon pouvoir antioxydant. À partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule citée plus haut. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentées sur la (Fig.29), qui montre une augmentation des doses dépendantes du pourcentage de piégeage du radical DPPH. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondant à 50 % d'inhibition ( $IC_{50}$ ). En comparant les  $IC_{50}$  de l'extrait testé ( $101,60 \pm 7,79 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport à celle de la vitamine C ( $5 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ), nous remarquons que l'activité antiradicalaire de l'extrait est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH• de la substance de référence.

Les résultats obtenus concernant l'effet antiradicalaire de l'extrait de la plante *Crataegus sp* ont montré une activité intéressante qui pourrait être attribuée à la présence des composés

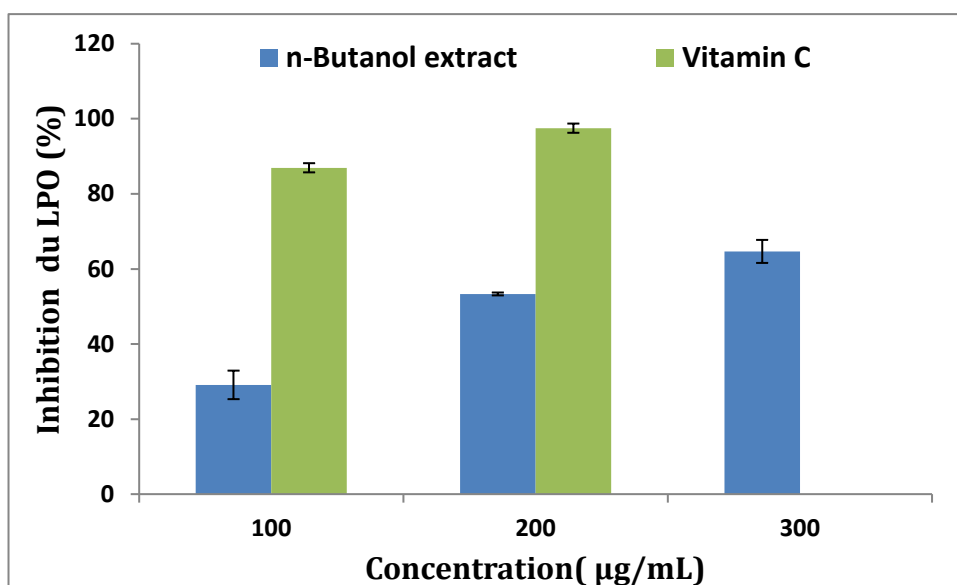
phénoliques comme les flavonoïdes, qui peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres.



**Figure 29:** Pourcentage de l'activité antiradicalaire de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus sp.* vis-à-vis du radical libre DPPH.

### 3. Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique

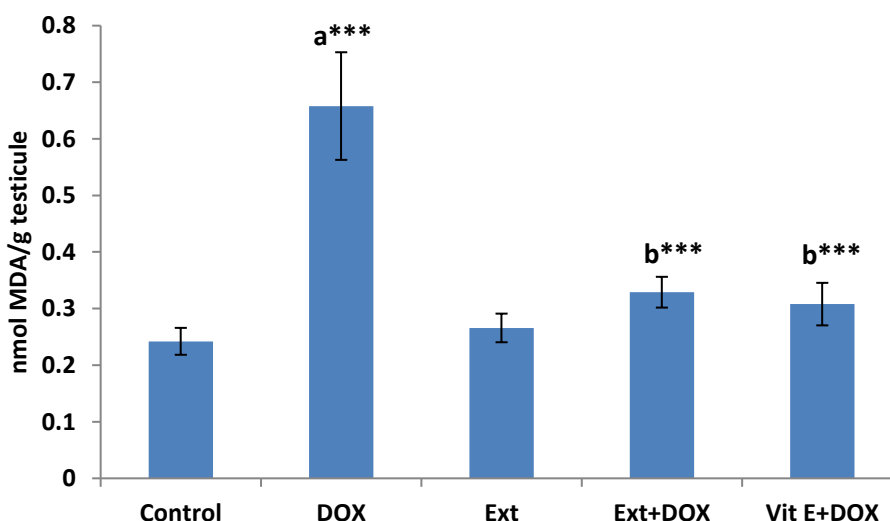
Dans la présente étude, nous avons évalué la capacité de l'extrait butanolique de la plante *Crataegus sp.* à inhiber la peroxydation lipidique induite par le FeSO<sub>4</sub>, en utilisant un homogénat de vitellus d'œuf. Il est indispensable de noter que la peroxydation lipidique est un paramètre puissant pour déterminer le potentiel antioxydant total de la plante par la formation des radicaux libres avec des effets délétères pour les molécules d'intérêt biologique. La (Fig.30), montre que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus sp.* et de la vitamine C est dose dépendante. 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 300 µg/mL (64,66%) et 200 µg/mL (86,95%) respectivement. La capacité inhibitrice de la peroxydation lipidique par l'extrait butanolique de la plante est due à son pouvoir antioxydant et antiradicalaire.



**Figure 26 :** Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* spet la vitamine C

#### 4. Effet protecteur de l'extrait *n*-butanol vis à vis la peroxydation lipidique

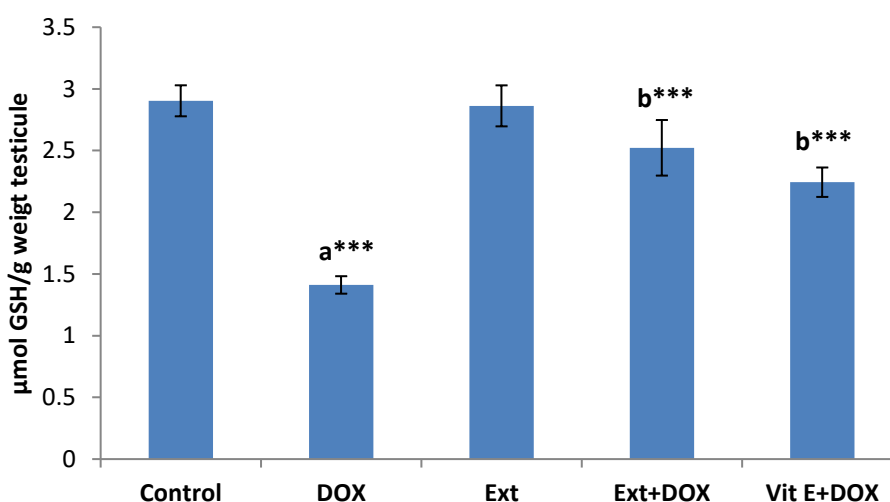
L'effet de la DOX sur la peroxydation des lipides est illustré sur la (Fig.31). La peroxydation lipidique est indiquée par une augmentation significative du MDA ( $p < 0.001$ ), par rapport au groupe témoin. Le prétraitement par l'extrait et la vitamine E a diminué significativement l'oxydation des lipides membranaires chez les rats traité par la DOX ( $p < 0.001$ ).



**Figure 27:** Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur la production du MDA dans Les cellules testiculaires. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student:\*\*\* $p < 0.001$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par la DOX.

## 5. Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur le niveau de GSH testiculaire

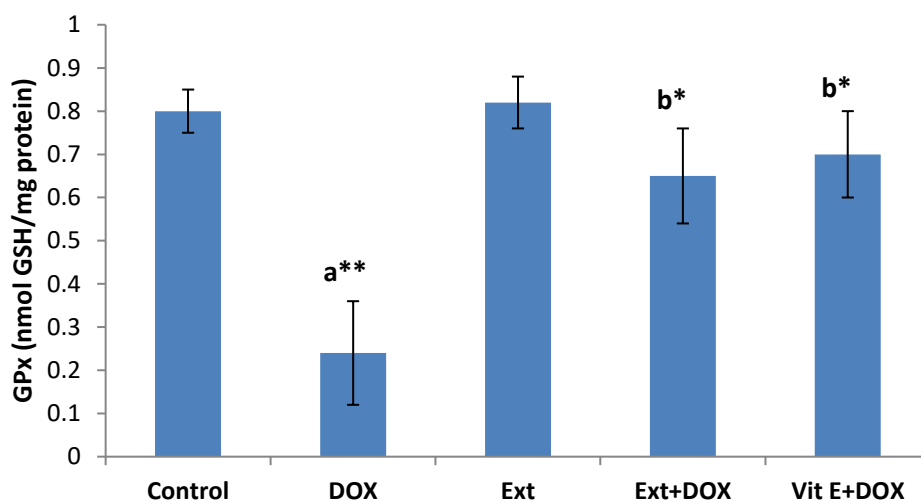
La (Fig.32) illustre l'effet de l'extrait sur la variation de glutathion (GSH) dans les cellules testiculaire chez les rats recevant la DOX, prétraités ou non par l'extrait butanolique. Nous avons remarqué une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de GSH chez les rats recevant la DOX par rapport au groupe témoin. En revanche, chez les rats recevant la DOX et traités par l'extrait, on constate une élévation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de GSH par rapport au groupe recevant la DOX.



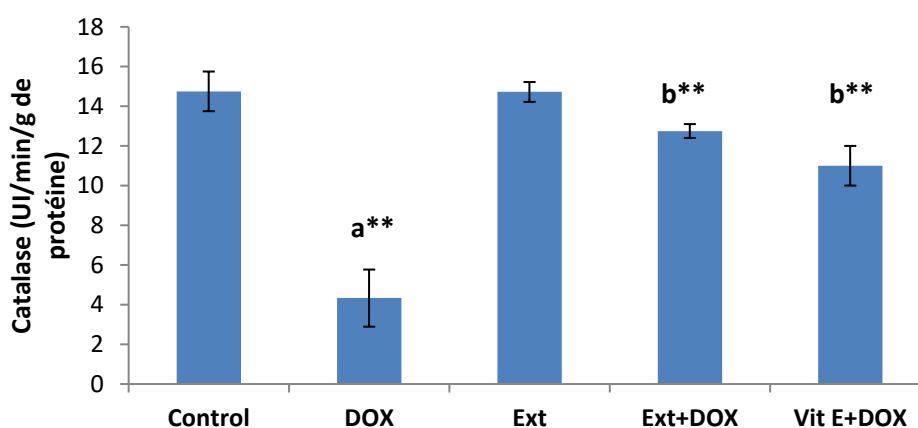
**Figure 28:** Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur la variation de glutathion (GSH) dans Les cellules testiculaires. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student : \*\*\* $p < 0.001$ . a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX.

## 6. Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité des enzymes antioxydante testiculaire (GPx et CAT) :

Les (Figures 33 et 34) montrent que l'administration de la DOX provoque une diminution significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité du CAT et du GPx chez les rats traités par la DOX comparativement au groupe témoin. Par ailleurs, le traitement des animaux par l'extrait (75 mg/kg) et la vitamine E associés à la DOX, a augmenté significativement ( $p < 0.05$ ) l'activité de ces enzymes au niveau des testicules.



**Figure 29:** Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans les cellules des testicules. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ . a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX.



**Figure 30:** Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la Catalase dans les cellules des testicules. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student : \*\* $p < 0.01$  a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX.

### 7. Étude histologique au niveau des testicules :

L'examen histologique des testicules des rats du groupe témoin (Tableau 4) a montré une architecture testiculaire conservée, dont les différentes couches sont présentes, une abondance remarquable des tubes séminifères et des spermatozoïdes endoluminaux dans la lumière des tubes séminifères ce qui indique que la spermatogenèse a été bien conservée jusqu'à stade de puberté (maturation). Aussi bien chez les rats traités par l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp (75 mg/kg) on observe des tubes séminifères avec spermatogenèse bien conservée (Tableau 4). Par contre les testicules des rats traités par la DOX (15 mg/kg) montrent une architecture testiculaire



minoritairement conservée, faite de tubes séminifères de morphologie également mal conservée, dont certains sont centrés par des aspects de silhouettes cellulaires sans noyaux visibles correspondant à des foyers de nécrose où les cellules passent par un stade de souffrance, un élargissement de l'espace inter-tubulaire, une congestion sanguine, Une diminution de l'abondance des spermatozoïdes avec une nécrose interstitielle ont été également observés (Tableau 4). En revanche, le traitement des rats avec l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp (75 mg/kg) et par la Vit E simultanément avec la DOX (15 mg/kg) a amélioré significativement les lésions testiculaires où on a remarqué une architecture testiculaire majoritairement conservée, faite de tubes séminifères dont l'abondance des spermatozoïdes a été clairement observée avec une spermatogenèse conservée et une absence presque totale des cellules nécrotiques (Tableau 4).

**Tableau 4:** effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de *Cataegus* sp et de la vitamine E vis avis les changements histopathologiques des testicules des rats induite par la DOX.

<b>Changements histopathologiques</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Extrait</b>	<b>DOX</b>	<b>Extr+DOX</b>	<b>Vit E+DOX</b>
Congestion	-	+/-	+++	+	+
Nécrose	-	-	+++	-	-
Nombre de spermatozoïdes	-	-	+++	+/-	+/-
Elargissement de l'espace inter-tubulaire	-	-	+++	+/-	+/-

(-): pas de changement histopathologique significatif; (+/-): degré léger; (+): degré modéré; (+++): degré sévère

## **II.2. Discussion :**

La DOX a été utilisé dans le monde entier en tant que médicament antinéoplasique ayant un large spectre d'activité contre différents types de tumeurs (Faiyaz *et al.*, 2013 ; Salem *et al.*, 2016). Son utilisation en clinique a été limitée en raison d'une large gamme d'effets indésirables toxiques sur différents organes, à savoir le cœur, le foie, les reins, les poumons et le cerveau (Ateşşahin *et al.*, 2006 ; Mohan etBhandare, 2012 ;Eleiwa *et al.*, 2018). De plus, il a été rapporté que la DOX peut également affecter les organes reproducteurs mâles (Sehgal etPandey, 1984 ; Sridevi *et al.*, 2012), provoquant ainsi une infertilité masculine (Prahalthan *et al.*, 2004 ; Shalizar Jalali etHasanzadeh, 2013 ; Türedi *et al.*, 2015). L'activité antioxydante de certains composés naturels pourrait être utilisée pour prévenir diverses maladies chroniques et protéger contre la toxicité de plusieurs agents cytotoxiques (Ola-Davies *et al.*, 2015), c'est pour cela que notre recherche actuelle a été conçue pour évaluer la capacité de la plante *Crataegus* sp à moduler la toxicité testiculaire induite par la DOX.

Des études antérieures ont montré l'effet de la DOX sur l'efficacité de la reproduction et la spermatogenèse chez le rat (Hozayen, 2012 ; Abdella et Ahmed, 2013). Ils ont également rapporté que ce médicament modifie la croissance, l'intégrité structurale et le taux de mobilité des spermatozoïdes en relation avec une apoptose cellulaire accrue des spermatogonies et des spermatocytes (Mansouri, 2019). La production des radicaux libres et l'induction du stress oxydatif sont impliquées fortement dans les dommages causés par la DOX (Hosseinzadeh *et al.*, 2009 ; Ahmed *et al.*, 2013 ; Uygur *et al.*, 2013).

Les testicules sont particulièrement sensibles au stress oxydatif (Tomascik-Cheeseman *et al.*, 2004), qui peut jouer un rôle critique en rendant l'ADN du sperme extrêmement sensible à la dénaturation, la fragmentation et à l'aberration, induisant ainsi les anomalies du sperme (Uygur *et al.*, 2013). D'autre part, malgré les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques présents dans les testicules et le plasma séminal, de nombreuses preuves ont montré qu'il existe un système de défense antioxydant faible dans le tissu testiculaire et le sperme (Rao *et al.*, 1989 ; Zini *et al.*, 1993 ; Gu et Hecht, 1997 ; Vernet *et al.*, 2004 ).

Dans la présente étude, une augmentation hautement significative ( $P < 0.001$ ) de la teneur en MDA a été observée dans les groupes traités par DOX par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreuses autres études (Ateşşahin *et al.*, 2006 ; Farsani *et al.*, 2018 ; Türedi *et al.*, 2015; Trivedi *et al.*, 2011 ) qui montrent que le traitement des rats par la DOX entraîne une augmentation significative des produits de la peroxydation lipidique (MDA), indiquant les effets pro-oxydants puissants de la DOX sur les tissus testiculaires (Uygur *et al.*, 2013). Il est très important de signaler que le tissu testiculaire a intrinsèquement un déficit dans un composant puissant de la famille SOD, la Mn-SOD (SOD2) (Yeh *et al.*, 2007), ce qui le rend plus exposé aux dommages oxydatifs induits par la DOX, notamment une peroxydation lipidique élevée. Cet événement pourrait être en relation avec l'architecture des membranes des cellules germinales mâles riches en AGPI, ce qui augmente leur susceptibilité à l'attaque par les ROS (Rao *et al.*, 1989 ; Lenzi *et al.*, 2002 ; Agarwalet al., 2006; Aitken et Roman, 2008 ; Hozayen, 2012; Mohamed *et al.*, 2015). Les radicaux libres générés par la DOX, agissent sur les AGPI de la membrane plasmique en les décomposant en aldéhydes, en particulier le MDA, entraînant ainsi une augmentation des dommages membranaires (Granados-Principal *et al.*, 2010 ; Hozayen, 2012)

De plus, des membres clés des enzymes antioxydantes internes (GSH, GPx et CAT) responsables de la conversion des radicaux libres et la protection des cellules contre les

dommages oxydatifs, sont remarquablement réduits après l'introduction de la DOX et leur activité a été significativement diminuée (Yeh *et al.*, 2007).

Le glutathion réduit (GSH) joue un rôle critique dans plusieurs processus biologiques importants, notamment le maintien de groupes sulfhydryle essentiel sur les protéines membranaires, le nettoyage des ROS par la formation de glutathion oxydé (GSSG) et d'autres disulfures, les réactions de désintoxication des médicaments impliquant la GST, la dégradation des peroxydes intracellulaires et la régulation de l'état d'oxydoréduction cellulaire (Pralalathan *et al.*, 2004 ; Ateşşahin *et al.*, 2006 ). Une baisse de son niveau cellulaire a été considérée comme indicateur du stress oxydatif (Taleb-Senouci *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, nous avons constaté une baisse hautement significative ( $P < 0.001$ ) du taux testiculaire en GSH chez les rats traités par la DOX par rapport aux sains témoins. Trivedi *et al.*, 2011 ont également enregistré des résultats similaires et suggèrent que la diminution du taux de GSH pourrait être liée à un déséquilibre du couple redox GSSG/GSH. Dans les conditions normales, la réduction de GSSG en GSH nécessite la présence du NADPH qui est fourni par l'enzyme G6PD dans la voie du pentose phosphate (Pralalathan *et al.*, 2004 ; Ateşşahin *et al.*, 2006 ; Vardi *et al.*, 2009). La DOX entraîne une diminution de l'activité de la G6PD qui est une enzyme clé du tissu testiculaire (Prasad *et al.*, 1995), ce qui réduit la disponibilité du NADPH, entraînant ainsi un déséquilibre du rapport GSSG/GSH (Pralalathan *et al.*, 2004; Çeribaşı *et al.*, 2012 ; Türedi *et al.*, 2015). La baisse du taux de GSH pourrait être responsable de la diminution observée de l'activité du GPx (Vardi *et al.*, 2009).

Les enzymes antioxydantes comme GPx et CAT sont considérées comme la première ligne de défense contre les espèces oxydatives, la plupart de ces enzymes deviennent inactives en raison de l'exposition à la DOX (Yeh *et al.*, 2009).

Dans notre étude, l'évaluation du système enzymatique antioxydant a mis en évidence une diminution significative ( $P < 0.01$ ) de l'activité du GPx et du CAT chez les rats traités par DOX comparativement aux sains témoins, ce qui montre l'effet perturbateur de la DOX sur le système antioxydant au niveau des testicules. Nos résultats sont en accord avec les autres rapports publiés par Haghi-Aminjan *et al.*, 2018, qui indiquent que la diminution de l'activité du GPx et du CAT est en corrélation avec le traitement par la DOX.

Dans notre étude, on a également marqué une anomalie de l'histologie des testicules des rats recevant la DOX comparativement aux sains témoins. En effet, on a observé une architecture testiculaire faite de tubes séminifères de morphologie minoritairement conservée, dont certains

sont centrés par des aspects de silhouettes cellulaires en souffrances, sans noyaux visibles correspondant aux foyers de nécrose. Ces observations sont en accord avec plusieurs rapports (Çeribaşı *et al.*, 2012). Un épithélium atrophique avec diminution du nombre des couches cellulaires, diminution de l'abondance des spermatozoïdes, élargissement de l'espace inter-tubulaire, une nécrose installée interstitiellement et une congestion sanguine ont été également observés. Ces résultats ont été enregistrés et validés dans les travaux de plusieurs chercheurs (Ateşşahin *et al.*, 2006 ; Çeribaşı *et al.*, 2012 ; Olusoji *et al.*, 2016 ; Haghi-Aminjan *et al.*, 2018).

En revanche, le traitement des rats par l'extrait de la plante *Crataegus* sp a amélioré significativement les effets néfastes de la DOX, notamment les paramètres du stress oxydatif ainsi que l'architecture histologique des testicules chez le rat.

Dans notre étude expérimentale, l'administration de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp (75 mg/kg) a réduit de manière significative le taux du MDA dans les testicules comparativement aux rats traités par la DOX. Cela révèle la capacité de la plante administrée simultanément avec la DOX d'atténuer les dommages causés par ce médicament. Ces observations sont en bon accord avec d'autres recherches où il a été prouvé l'effet protecteur de différents extraits de plantes contre les dommages oxydatifs causés par la DOX. En effet, Shalizar Jalali et Hasanzadeh, 2013 ont montré le rôle de l'extrait aqueux des fruits de la plante *Cratagus monogyna* (20 mg/kg), très riche en composés phénoliques, notamment les proanthocyanidines et les flavonoïdes qui le confère un rôle crucial dans la prévention du stress oxydatif dû au traitement par la DOX (4mg/kg). Cet effet est caractérisé par une diminution du taux des radicaux libres et du stress oxydatif ainsi qu'une augmentation du niveau des enzymes antioxydantes. Les travaux de Yeh *et al.*, 2009 ont expliqué que l'extrait de *Ginkgo biloba* (5 mg/kg) entraîne une diminution significative du taux de MDA et une augmentation remarquable des enzymes antioxydantes dans les testicules des rats recevant la DOX (3 mg/kg).

Après le traitement des rats par l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp (75 mg/kg), le taux du GSH a été nettement augmenté dans les testicules comparativement aux rats traités par la DOX. Cette amélioration de la teneur en GSH en présence de l'extrait butanolique est en accord avec les études d'Ateşşahin *et al.*, 2006 et Türedi *et al.*, 2015, qui ont montré l'effet protecteur du lycopène et de Resvératrol, respectivement vis-à-vis la toxicité testiculaire induite par la DOX.

L'activité de GPx et du CAT a été également améliorée dans les testicules des rats recevant l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp (75 mg/kg) comparativement aux rats traités par la

DOX. Toutefois, cette constatation est cohérente avec celle apportée par Olusoji *et al.*, 2016, qui suggèrent que l'acide gallique en tant qu'un antioxydant puissant a un effet protecteur contre la toxicité testiculaire induite par la DOX, ceci se traduit par l'amélioration de l'activité des enzymes antioxydantes.

Nos résultats ont prouvé également que l'administration de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp (75 mg/kg) aux rats traités par la DOX a amélioré significativement l'architecture histologique des testicules. Ce résultat est en accord avec les travaux d'Ahmed *et al.*, 2013 qui ont expliqué le rôle bénéfique de *Ficus racemosa* contre les dommages toxiques provoqués par la DOX, où ils ont également indiqué que *Fucus racemosa* est une source très riche en composés phénoliques, elle possède d'excellentes propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, protégeant ainsi l'architecture testiculaire contre les dommages oxydatifs induits par la DOX (Ahmed et urooj, 2009). Un tel résultat a été signalé aussi par Nowrouzi *et al.*, 2019, où ils ont montré l'effet protecteur de l'extrait de *Rosa canina* vis-à-vis la toxicité testiculaire et le stress oxydatif induits par la DOX, ils ont également indiqué une amélioration des propriétés histopathologiques, une réduction significative des dommages histomorphométriques et de la perte de cellules germinales chez les groupes traités avec un extrait de *R. canina* / doxorubicine, par rapport à ceux uniquement traités avec la DOX. Ces résultats suggèrent l'effet protecteur de l'extrait de *R. canina* contre la gonadotoxicité de la doxorubicine. Les travaux d'Eleiwa *et al.*, 2018 ont bien expliqué que l'administration simultanée de *Spirulina platensis* et de la DOX a amélioré significativement l'architecture testiculaire des rats ; grâce à sa richesse en composés phénoliques notamment les proanthocyanidines. Cette amélioration a été confirmée par la structure histopathologique normale du tissu testiculaire qui a été probablement due en raison de la présence des antioxydants naturels puissants et des piègeurs des radicaux libres dans la spiruline qui protège le tissu testiculaire et améliore les paramètres liés à la fertilité masculine chez le rat.

L'activité protectrice de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp est attribuée à sa richesse en phénols et en flavonoïdes, ce qui permet d'avoir des effets antioxydants bénéfiques qui se traduisent par la réduction de la peroxydation lipidique, l'augmentation du statut antioxydant en limitant les phénomènes radicalaires et en favorisant la réparation des dommages oxydatifs.

La vitamine E joue un rôle biologique fondamental avec une capacité antioxydante élevée, en particulier en protégeant les cellules et les tissus des dommages oxydatifs et de la

peroxydation des lipides membranaires et des lipoprotéines grâce à son puissant effet de balayage des radicaux libres (Claycombe et Meydani, 2001 ;Gokcimen *et al.*, 2007 ; Mandil *et al.*, 2016 ). En général, des études précliniques ont montré que l'administration de la vitamine E par voie orale augmente les actions antitumorales et protège contre les effets toxiques de la DOX (Quiles *et al.*, 2006). Néanmoins, il a été rapporté que les vitamines E peut augmenter l'expression des glycoprotéines P (P-gp) et du facteur-1alpha inducible par l'hypoxie dans les cellules tumorales de la prostate surexprimant Nox-1 (Wartenberg *et al.*, 2005). Par conséquent, la vitamine E peut renforcer la résistance à la chimiothérapie, bien que cette proposition nécessite des études plus approfondies. En tant qu'agent bénéfique, la vitamine E s'est avérée allonger la durée de vie des animaux de laboratoire et diminuer la perte de poids provoquée par la chimiothérapie (Granados-Principal *et al.*, 2010).

Dans le but de tester l'effet protecteur de la vitamine E vis-à-vis de la toxicité testiculaire aiguë induite par la DOX, on a prétraité les rats par une forte dose de vitamine E (100 mg/kg) par voie orale, suivie de la DOX. Il semble que le dosage et le calendrier du traitement par la vitamine E soient importants pour lui permettre de jouer un rôle préventif.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le prétraitement des rats par la Vit E (100mg/kg) à diminué significativement le taux du MDA au niveau des testicules comparativement aux rats traités par la DOX. Les antioxydants protègent les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, qui sont des sous-produits naturels du métabolisme de l'oxygène. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Prahalathan *et al.*, 2004 qui ont montré l'effet protecteur de la Vit E contre la toxicité testiculaire induite par la DOX.

Le prétraitement des rats par la Vit E (100mg/kg) à augmenté significativement les niveaux du GSH, et il a entraîné une amélioration remarquable de l'activité enzymatique du GPx et du CAT au niveau des testicules. Notre étude actuelle a prouvé que la Vit E (100mg/kg) a pu protéger les testicules des rats contre les dommages oxydatifs et les changements morphologiques observés chez les rats traités par la DOX. Ces résultats concordent avec la recherche de Mandil *et al.*, 2016.

**Conclusion :**

L'ensemble de nos travaux a permis de prouver que l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp possède des activités antioxydantes puissantes grâce à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes.

Les résultats obtenus dans la présente étude, ils ont permis de conclure que :

-Le traitement des rats par la DOX a provoqué :

- ✓ Un accroissement significatif du niveau de MDA indiquant l'augmentation de la peroxydation lipidique, une diminution du taux de GSH et un effondrement accru du statut antioxydant testiculaire (GPx, CAT). Ces résultats expliquent bien que la toxicité de la DOX est accompagnée d'un stress oxydatif et une génération des radicaux libres toxiques.
- ✓ Des changements morphologiques remarquables et des altérations qui ont touché l'architecture du tissu testiculaire étudié.

-Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp a permis de :

- ✓ Restaurer les dommages oxydatifs et rétablir les paramètres du stress oxydant à leurs valeurs normales.
- ✓ Améliorer l'architecture du tissu testiculaire étudié en réduisant le pourcentage des changements morphologiques provoqués par la DOX.

## Résumé :

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp (Rosacées) contre le stress oxydant induit par la doxorubicine au niveau des testicules des rats *Wistar albinos* en utilisant des paramètres biochimiques et histopathologiques.

Dans le but de tester le pouvoir antioxydant de cette plante *in vivo*, l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp (75 mg/kg) ou la vitamine E (100 mg/kg) a été administré par gavage pendant 10 jours, en combinaison avec un traitement par la DOX (15 mg/kg), administré par voie i.p dans le 8<sup>ème</sup> jour aux rats. Les animaux ont été sacrifiés et disséqués dans le 11<sup>ème</sup> jour. Un prélèvement testicules a été effectué, suivie par une homogénéisation afin d'évaluer la toxicité, en réalisant un dosage des paramètres du stress oxydatif : l'indicateur de la peroxydation lipidique (MDA), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion réduit (GSH).

La DOX agit essentiellement en provoquant un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant, qui se traduit par une augmentation importante du taux de MDA ainsi qu'une diminution significative du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx et CAT). Ce dysfonctionnement induit par la DOX a été également accompagné par des altérations et des changements de l'architecture des testicules, notamment la diminution du taux des spermatozoïdes, l'élargissement de l'espace inter-tubulaire, une congestion sanguine, nécrose cellulaire et interstitielle. En revanche, le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp et la Vit E a permis de rétablir les paramètres de stress oxydatif à la valeur normale et d'améliorer nettement le statut antioxydant ainsi que l'histologie du tissu testiculaire étudié.

Les tests *in vitro* (piégeage de radical DPPH et inhibition de LPO) de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp ont révélé qu'il présente un pouvoir antioxydant très important ; ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux.

**Mots clés:** *Crataegus* sp, Doxorubicine, Stress oxydatif, Toxicité testiculaire, activités antioxydantes, les composés phénoliques.



**Abstract:**

The present study was carried out to evaluate the protective effect of the *n*-butanol extract of *Crataegus* sp (Rosaceae) against DOX-induced oxidative stress and histopathological changes in testis tissues of *Wistar albinorats*. The butanolic extract of *Crataegus* sp (75 mg/kg) or vitamin E (100 mg/kg) was administered by gavage for 10 days, in combination with intraperitoneal injection of DOX (15mg/kg) in the 8<sup>th</sup> day to male rats. At the end of the experiment (on the 11<sup>th</sup> day), animals were sacrificed and testes were removed for oxidative stress biomarkers [such lipid peroxidation (LPO), Catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and reduced glutathione (GSH) and histopathological study.

DOX acts essentially by disrupting the oxidant/antioxidant balance; this dysfunction is expressed by a significant increase in the level of MDA and a significant decrease in GSH and antioxidant enzyme activities (GPx, CAT). Severe histopathological changes in testes were observed, including decreased sperm count, enlargement of the inter-tubular space, blood congestion, cellular and interstitial necrosis. In contrast, the pretreatment of the rats with the butanolic extract of *Crataegus* sp (75 mg/kg) and Vit E (100 mg/kg) restored significantly oxidative stress parameters to the normal value and improved clearly the antioxidant status as well as the histopathological alterations.

The results of the *in vitro* evaluation of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging effect and lipid peroxidation showed the good antioxidant power of the *n*-butanol extract of *Crataegus* sp. These results were correlated with the total phenolic and flavonoid contents of this extract.

**Keywords:** *Crataegus* sp, Doxorubicin, Oxidative stress, Testicular toxicity, Antioxidant activities, Phenolic compounds.

## الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير الوقائي للمستخلص البيتانولي لنبات *Crataegus sp* و فيتامين E اتجاه السمية الحادة المحرصة بواسطة دواء DOX عند ذكور الجرذان من سلالة *albinosWistar* و تتبع الأثر السمي لهذا الدواء و ما ينجم عنه من اضطرابات بيوكيماوية و نسيجية على مستوى الخصي. لهذا الغرض تم حقن الجرذان بعقار DOX بتركيز (15مجم/كجم من وزن الجسم) في تجويف البطن في اليوم الثامن بعد معاملة نفس الجرذان و لمدة 10 أيام بالمستخلص البيتانولي لنبات *Crataegus sp* (75 ملغ/كغ) او بفيتامين E (100 ملغ/كغ).

أظهرت نتائج هذه التجارب التأثير السمي لهذا الدواء من خلال الارتفاع المعنوي في مستوى مؤشرات الإجهاد التأكسدي (MDA) و الانخفاض المعنوي في مستوى الGSH و كذلك في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (GPx, CAT)، بالإضافة الى تغيرات في الهندسة النسيجية على مستوى الخصية، حيث لوحظ نقص معنوي في مستوى الحيوانات المنوية، اتساع الفضاء البيني الموجود بين الأنابيب المنوية، تمدد الأوعية الدموية و نخر خلوي.

كما بينت النتائج المحصل عليها في هذه الدراسة، الدور الوقائي الفعال لكل من المستخلص البيتانولي لنبات *Crataegus sp* و فيتامين E ، حيث لوحظ انخفاض معنوي في نسبة مؤشر الأكسدة الفوقية للدهون (MDA) و ارتفاع في مستوى الGSH و كذلك نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (GPx, CAT) ، كما أظهرت نتائج الدراسة النسيجية تحسن البنية المورفولوجية لنسيج الخصية، حيث عمل كل من المستخلص البيتانولي للنبات و فيتامين E على ترميم الهندسة النسيجية المتضررة بفعل التأثير السام لدواء DOX و تعديل مستوى الحيوانات المنوية و كذلك تم تسجيل غياب كلي للخلايا التي تعرضت للنخر .

أكدت التجارب خارج العضوية (اقتناص جدور DPPH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات)، الفعل المضاد للأكسدة للمستخلص البيتانولي لنبات *Crataegus sp*، اذ يتمتع هذا المستخلص بكفاءة عالية في اقتناص الجذور الحرة و اختزال الأضرار الناجمة عن الإجهاد التأكسدي و ترميم الأضرار التأكسدية في مختلف البنيات ذات الأهمية البيولوجية و هذا راجع إلى احتواء هذا المستخلص على نسب معتبرة من المركبات الفينولية و الفلافونيدات ذات النشاط المضاد للأكسدة.

**الكلمات المفتاحية:** Doxorubicin, *Crataegus sp*, التوتّر التأكسدي، سمية الخصية، الفعل المضاد للأكسدة، المركبات الفينولية.

**Références :**

**Abdella, EM., Ahmed, R. (2012).**Suppression of doxorubicin apoptotic, histopathologic, mutagenic and oxidative stress effects in male mice bone marrow and testis tissues by aqueous rosemary leaves extract. *Iran J Cancer Prev*, 2:35-49.

**Abdul-Ghani, A.S., Amin, R., Suleiman, MS. (1988).**Hypotensive effect of *Crataegus oxyacantha*.*Int. J. Crude Drug Res*, 25:216-220.

**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.

**Agarwal A., Gupta S., Sikka S. (2006).** The role of free radicals and antioxidants in reproduction.*Curr.Opin. Obstet. Gynecol*, 18(3): 325-332.

**Ahmed F, Urooj A. (2009).** Antioxidant activity of various extracts of *Ficus racemosa* stem bark. *National Journal of Life Sciences*, 6:69-74.

**Ahmed, F., Urooj, A., Karim, AA. (2013).** Protective effects of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced renal and testicular toxicity. *Pharmacogn Mag*, 9(34): 130–134.

**Aitken RJ., Roman SD. (2008).** Antioxidant systems and oxidative stress in the testes.*Oxid. Med. Cell Longev*, 1: 15-24.

**Akbas SH, Yegin A, Ozben T. (2005).**Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem*, 38(11): 1009-1014.

**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.

**Amandeep, K., Manpreet, K., Sunil, K., Ramica, S., Rana, A. (2012).** Doxorubicine: a critical review on toxicity. *Journal of Pharmacy Research*, 5(5):2890-2894.

**Ambrogini, P., Betti, M., Galati, C., Palma, M., Lattanzi, D., Savelli, D., Cuppini, R. (2016).**Tocopherol and Hippocampal Neural Plasticity in Physiological and Pathological Conditions. *Int. J. Mol. Sci*, 17:1-32.

**Aouacheri, W., Saka, S., Djafer, R., Lefranc, G. (2009).** Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez les rats. *Ann Biol Clin*, 67(6):619-627.

**Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafeian-Kopaei, M. (2017).**The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in improving it: A Review. *J Clin Diagn Res*, 11(5):1-5.

- Ateşşahin, A., Türk, G., Karahan, I., Yilmaz, S., Ceribaşı, AO., Bulmuş, O. (2006).** Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril*, 85(1):1216-1222.
- Atik Bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb Bendlab, S.A., Boti, JB., Casanova, J. (2007).** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*, 7 : 6-11.
- Badkoobeh, P. M., Parivar, K. P., Kalantar, S. M., Hosseini, S. D., Salabat, A. (2013).** Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin- induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. *Iran J Reprod Med*, 11(5):355-364.
- Bahorun, T., Trotin, F., Pommery, J., Vasseur, J., Pinkas, M. (1994).** Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Medica*, 60: 323-328.
- Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council*: 83-94.
- Baudin, B. (2006).** Stress oxydants et pathologies cardiovasculaires. *Mt cardio*, 2(1) :43-52.
- Beloued, A. (2012).** *Plantes Médicinales d'Algérie*. Paris. Office des publications universitaires. (6Ed).
- 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
- Bézanger, L., Pinkas, B. (2014).** Plantes médicinales de la région du Nord (Nord, Pas-de-Calais, Somme). *Bulletin de la Société Botanique en France*, 111(3) :380-404.
- Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., Durand, G., Jardillier, JC. (2003).** Radicaux libres et antioxydants. In: Ed. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires* . Paris : *Medecine-sciences Flammarion*. (Ed).
- Bouzid, W. (2008).** Etude de l'Activité Biologique des Extraits du Fruit de *Crataegus Monogyna* Jacq. *Mémoire de Magistère*. Université-El hadj Lakhder –Batna: 88.
- Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L. (2001).** Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod*, 64: 892-895
- Brilhante, O., Stumpp, S., Miraglia, S. (2011).** Long-term testicular toxicity caused by doxorubicin treatment during pre-pubertal phase. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3(2):52-60.
- Bruneton, J. (1993).** *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*. Paris. *Technique et Documentation-Lavoisier*. (2 Ed).
- Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales*. Paris. *Tec & Doc.*, (3 Ed).

- Cao, U., Ikeda, I. (2009).** Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. *IntJ Biol Macromol*, 45:231-235
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S. (2009).** Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25) :3267-3285.
- Castel, M., Despas, F., Modesto, A., Gales, C., Honton, B., Galinier, M., Pathak, A. (2013).** Effets indésirables cardiaques des chimiothérapies. *La Presse Médicale*, 42(1) :26-39.
- Çeribaşı, AO., Sakin, F., Türk, G., Sönmez, M., Ateşşahin, A. (2012).** Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Patho*, 64(7-8) :717-724.
- Chabory, E. (2009).** Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine. Thèse doctorat en Génétique .UNV Blaise pascal-Clermont ferrand II : 379
- Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F., Chow, MS. (2002).** Hawthorn. *Journal Clinical Pharmacology*, 42:605-612.
- Chavalle, T. (2017).** Contribution à L'etude de la Pharmacocinétique et de la Tolérance de la Doxorubicine Chez le Chien. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire .UNV Claude-Bernard - Lyon I : 187
- Chen, J., Lan, J., Dongle, L., Backman, L., Zhang, W., Zhou, Q., Danielson, P. (2017).** Ascorbic Acid Promotes the Stemness of Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells and Accelerates Epithelial Wound Healing in the Cornea. *Stem cells translational medicine*, 6 :1356-1365.
- Cillard, J., Cillard, P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *OCL*, 13(1):24-29.
- Claiborne, A. (1985).** Catalase activity. In: Greenwald, R.A. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, BocaRaton. (Ed).
- Claycombe, KJ., Meydani, SN. (2001).** Vitamin E and genome stability. *Mutat. Res*, 475: 37 44.
- Comhair, S., Erzurum, S. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(2) :246-255.
- Cushnie, TP, Tim., Lamb, AJ.(2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
- Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., Del Tacca, M. (2002).** Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin. Pharmacokinet*, 41(6):431-444.
- Deaton, CHM., Marlin, DJ. (2003).** Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*, 2(3): 278-291.

- Della Loggia, R., Tubaro, A., Zilli, C., Redaelli, C. (1983).** Depressive effect of *Crataegus oxyacantha* L. on central nervous system in mice. *Scientia Pharm*, 51: 319-324.
- Das, J., Ghosh, J., Manna, P., Sil, PC. (2012).** Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino Acids*, 42(5): 1839-1855.
- Dash, B., Phillips, T. (2013).** Molecular Characterization of a Catalase from *Hydra vulgaris*. *Gene*, 501(2): 144- 152.
- De Wolf, FA. (1991).** Binding of doxorubicin to cardiolipin as compared to other anionic phospholipids-an evaluation of electrostatic effects. *Biosci Rep*, 11(5):275-84.
- Dirican, E., Türkez, H. (2012).** Genotoxic effect of beryllium chloride and protective role of *Crataegus oxyacantha* L. (hawthorn) fruit extract in vitro. *Fresenius Environm. Bull*, 21 :1578-1582.
- Djerroumi, A., Nacef, M. (2004).** 100 plants médicinaux d'Algérie. Palais du livre. (1Ed).
- Duarte, TL., Jones, GDD.(2007).** Vitamin C modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 1165–1175.
- Duarte, TL., Cooke, MS., Jones, GDD.(2009).** Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 46: 78–87
- Dutertre, JM. (2011).** Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse doctorat. UNV Bordeaux 2-Victor Segalen U.F.R des sciences médicales- France : 33
- Elango, C., Devaraj, SN. (2010).** Immunomodulatory effect of hawthorn extract in an experimental stroke model. *J. Neuroinflam*, 7(97): 2-13.
- Eleiwa, N Z., Galal, AA., Abd El-Aziz, RM., Hussin, EM. (2018).** Antioxidant activity of *Spirulina platensis* alleviates doxorubicin-induced oxidative stress and reprotoxicity in male rats. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(2): 87–95.
- Ellman, GL. (1959).** Plasma Antioxidants. *Arch. Biochem Biophys*, 82:70-77.
- Faiyaz, A., Asna, U., Alias A. K. (2013).** Protective effects of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced renal and testicular toxicity. *Pharmacogn Mag*, 9(34): 130–134.
- Farsani, B. E., Karimi, S., Mansouri, E. (2018).** Pravastatin attenuates testicular damage induced by doxorubicin – a stereological and histopathological study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 30(1): 1-6.

- Fikret Balta, M., Çelik, F., Turkoglu, N., Ozrenk, K., Ozgokçe, F. (2006).** Some Fruit Traits of Hawthorn (*Crataegus* spp.) Genetic Resources from Malatya, Turkey. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2(6): 531-536.
- Flohe, L., Gunzler, WA.(1984).** Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105: 114-121.
- Formica, JV., Regelson, W. (1995).** Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids. *Fd Chem.Toxic*, 33: 1061-1080
- Förstermann, U., Xia, N., Huige, L. (2017).** Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 120(4):713-735.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011).** Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal*, 15(6) :1583- 1606.
- Gallani, A. (1889).** Etude du profil de sécurité des spécialités à base de doxorubicine: influence de la forme. Thèse doctorat en Sciences du Vivant /Génétique .UNV de Lorraine : 183
- Gardés-Albert, M., Bonne, f.-R. D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique*. 91-96.
- Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4):162-169.
- Gigli, M., Rasoanaivo, TW., Millot, JM., Jeannesson, P., Rizzo, V., Jardillier, JC., Arcamone, F., Manfait, M. (1989).** Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'- iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. *Cancer Res*, 49(3):560-564.
- Gokcimen, A., Cim, A., Tola, HT., Bayram, D., Kocak, A., Ozgüner, F., Ayata, A. (2007).** Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. *Hum Exp Toxicol*, 26(6):519-25.
- Granados-Principal, S., Quiles, JL., Ramirez-Tortosa, CL., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, MC. (2010).** New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and chemical toxicology*, 48(6):1425-1438.
- Gu, W., Hecht, NB. (1997).** The enzymatic activity of Cu/Zn superoxide dismutase does not fluctuate in mouse spermatogenic cells despite mRNA changes. *Exp Cell Res*, 232(2):371–375.
- Guermonprez, M., Pinkas, M., Torck, M. (1997).** Matière médicale homéopathique. Sainte-Foy-lès-Lyon, Boiron. (2Ed).
- Hacker-klom, U., Meistrich, M. L., Göhde, W. (1986).** Effect of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin on mouse spermatogenesis. *Mutation Research*, 160(1):39-46.

- Haghi-Aminjan, H., Asghar, M. H., Farhood, B., Rahimifard, M., Goradel, N. H., Abdollahi, M. (2018).**The role of melatonin on chemotherapy-induced reproductive toxicity. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(3):291-306.
- Haleng, J., Pince, MJ., Defraigne, J., Charlier, C., Chapelle, J. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liège*, 62(10):628-638.
- Hanus, M., Lafon, J., Mathieu, M. (2004).**Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Curr. Med. Res. Opin*, 20:63-71.
- Heffner, L. J. (2001).** *Reproduction humaine*. (Paris ; Bruxelles). Blackwell science Ltd. (1Ed).
- Heim, Ek., Tagliaferro, AR., Bobilya, DJ., (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- 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.
- Hermance, B. (2018).** Effets des chimiothérapies pédiatriques sur l'intégrité de l'ADN des cellules germinales mâles. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor en Biologie .UNV Québec: 229
- Hobbs, C., Foster, S. (1990).** Hawthorn: a literature review. *Herbal Gram*, 22:19-33.
- Hoffmann, D. (2003).** *Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine*. Inner Traditions / Bear & Co. (Ed).
- Honda, Y., Kessoku, T., Sumida, Y., Kobayashi, T., Kato, T., Ogawa, Y., Imajo, K. (2017).** Efficacy of glutathione for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an open-label, single-arm, multicenter, pilot study. *BMC Gastroenterology*, 17(96):1-8.
- Hosseinzadeh CA., Pouramir, M., Tahmasbpour ME., Jorsaraei, SG. (2009).** Relationship between Seminal Malondialdehyde Levels and Sperm Quality in Fertile and Infertile Men. *Braz Arch Biol Technol* 2009, 52 (6):1387-1392.
- Hozayen, WG. (2012).** Effect of hesperidin and rutin on doxorubicin induced testicular toxicity in male rats. *International journal of food and nutrition science*, 1(1): 31-42.
- Hrazdina, G., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. Grisebach, H., (1976)** Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro, 175(2) : 392-399.
- Hughes, CS., Vaden, SL., Manaugh, CA., Price, GS., Hudson, LC. (1998).** Modulation of doxorubicin concentration by cyclosporin a in brain and testicular barrier tissues expressing P-glycoprotein in rats. *J Neurooncol*, 37: 45–54.



- Iacqua, A., Aversa, A., Francomono, D. (2017).** The Physiology of the Testis. ResearchGate:1-38.
- Islam, T., Manna, M., Reddy, M. (2015).** Glutathione Peroxidase of *Pennisetum glaucum* (PgGPx) Is a Functional Cd<sup>2+</sup> Dependent Peroxiredoxin that Enhances Tolerance against Salinity and Drought Stress. Plos one, 10(11):1-18.
- Javanovic, SV., Steenken, S., Tosic, M., Marganovic, B., Simic, MJ. (1994).** Flavonoids as antioxidants. Journal of the American Chemical Society, 116: 4846-4851.
- Jouad, H., Lemhadri, A., Maghrani, M., Burcelin, R., Eddouks, M. (2003).** Hawthorn evokes a potent anti-hyperglycemic capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. J. HerbalPharmacother, 3: 19-29.
- Kamina, P. (2013).** L'essentiel en Anatomie. Paris- France- Espagne. Editions Maloine.(Ed).
- Kang, JH., Lee, YJ., No, KO. (2002).** Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. Reproductive Toxicology, 16(3): 291-298.
- Kao, ES., Wang, CJ., Lin, WL., Chu, CY., Tseng, TH., (2007).** Effects of polyphenols derived from fruit of *Crataegus pinnatifida* on cell transformation, dermal edema and skin tumor formation by phorbol ester application. Food and Chemical Toxicology, 45(10):1795-1804.
- Karna, KK., Choi, BR., You, JH., Shin, YS., Soni, KK., Cui, WS., Lee, SW., Kim, CY., Kim, HK., Park, JK. (2019).** Cross-talk between ER stress and mitochondrial pathway mediated adriamycin-induced testicular toxicity and DA-9401 modulate adriamycin-induced apoptosis in Sprague-Dawley rats. Cancer Cell Int: 19(85) : 1-11
- Kehili, N., Saka, S., Aouacheri, O. (2017).** L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. Phytothérapie, 1:1-10
- Keizer, H G., Pinedo, HM., Schuurhuis, GJ. (1990).** DOXORUBICIN (ADRIAMYCIN):a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. National Institutes of Health, 47(2):219-231.
- Kim, Y., Ma, AG., Kitta, K., Fitch, SN., Ikeda, T., Ihara, Y., Simon, AR., Evans, T., Suzuki, YJ. (2003).** Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. Mol Pharmacol, 63(2):368-77.
- Koleini, N., Nickel, B. E., Edel, A. L., Fandrichb, R. R., Ravandia, A., Kardamia, E. (2019).** Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. Chemico-biological interactions, 303:35-39.
- Kopalli, SR., Cha, KM., Hwang, SY., Jeong, MS., Kim, SK. (2016).** Korean red ginseng protects against doxorubicin-induced testicular damage: An experimental study in rats. Journal of Functional Foods, 20: 96-107.
- Kremer, B. (2011).** Arbres et arbustes. 400 espèces. Paris. Gunter Steinbach. (Ed).

- Kumar, J., Teoh, S., Das, S., Mahaknaukrah, P. (2017).** Oxidative Stress in Oral Diseases: understanding its relation with other systemic diseases. *Frontiers in Physiology*, 8:1-5.
- Lal, S., Mahajan, A., Chen, WN., Chowbay, B. (2010).** Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Curr Drug Metab*, 11(1):115-28.
- Lauzon, C. (2008).** Etude des mécanismes de toxicité induite par l'adriamycine et sensibilisation des cellules cancéreuses par le choc thermique. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. UNV du Claude-Bernard - Lyon I- Montréal: 124
- Lenzi, A., Gandini, L., Lombardo, F., Picardo, M., Maresca, V., Panfili, E., Tramer, F., Boitani, C., Dondero, F. (2002).** Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception*, 65:301–304.
- Leung, AY., Foster, S.(1996).** Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs, and Cosmetics. New York. John Wiley. (2Ed).
- Lhuillier, A. (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. F ex oliver, *Agauia polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa Trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique -Toulouse.
- Liu, J., Mao, W., Ding, B., Liang, CS. (2008).** ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(5):1956-1965.
- Liu, L., Zhao, Y., Han, W., Chen, T., Hou, G., Tong, X. (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.
- Ljubuncic, P., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A. (2005).** Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3):153-161.
- Lowry, OH., Rosegrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ.(1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*1951, 193:265-275.
- Lu, H., Zhu, Z., Yao, X., Zhao, R., Yan, C., Zhang, Y., Lin, Y. (2005).** Hepatic preconditioning of doxorubicin in stopflow chemotherapy: NF-kB/IkB pathway and expression of HSP72. *World J. Gastroenterol*, 11(14):2136-2141.
- Lyu, YL., Liu, LF. (2012).** Doxorubicine cardiotoxicity revisited: ROS versus top2. *Recent advances in cancer research and therapy*, 19:351-369.
- Mac Laren D. (2007).** Nutrition and Sport: Advances in sports and exercise science series. In: Close GL, Mc Ardle F. Antioxidants and free radicals. Chapter 8. Churchill Livingstone. (1Ed).

- Magosso, E., Ansari, M., Gopalan, Y., Shuaib, I., Wong, J., Khan, N., Yuen, K. (2013).** Tocotrienols for normalization of hepatic echogenic response in nonalcoholic fatty liver: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Nutr.j*, 12(1):166.
- Mandil, R., Rahal, A., Prakash, A., Garg, SK., Gangwar, NK., Swain, DK. (2016).** Ameliorative potential of  $\alpha$ -tocopherol against flubendiamide and copper-induced testicular-insult in Wistar rats. *Chem Biol Interact*, 260:91-101.
- Mansouri, E. (2019).** Pravastatin attenuates testicular damage induced by doxorubicin - A stereological and histopathological study. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 30(1): 103–109.
- Marfak A., (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. UNV de LIMOGES : 187 .
- Marieb, E. N., Wilhelm, P. B., Mallatt, J. (2007).** Human Anatomy. San Francisco, United States of America. Pearson Education, Inc. (6 Ed).
- Marieb, E., Hoehn, K. (2010).** Human anatomy & physiology. Paris: Person Education, Inc. (8 Ed).
- Martini, F. H., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B. (2012).** Human Anatomy. United States of America: Pearson Education, Inc. (7 Ed).
- Mates, JM.(2000).** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol*, 153(1-3): 83-104.
- Mattera R., Benvenuto M., Giganti MG., Tresoldi I., Pluchinotta FR, Bergante S., Tettamanti G., Masuelli L., Manzari V., Modesti A., Bei R. (2017).** Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients*, 9 (523):1-43.
- Mazevet, MH. (2016).** Etude de la cardiotoxicité induite par les traitements anticancéreux : Rôle d'Epac dans la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine. Thèse de doctorat en Biologie moléculaire .UNV Paris-saclay- Paris: 303.
- Mecheri, A., Amrani, A., Benabderrahmane, W., Benaissa, O., Boubekri, N., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S. (2018).** Les polyphénols de l'extrait n-butanol de *Crataegus oxyacantha*: Evaluation de leur pouvoir antioxydant et protecteur vis-à-vis la toxicité de la doxorubicine. *Phytothérapie*, 16(1):22–31.
- Mecheri, A., Benabderrahmane, W., Amrani, A., Boubekri, N., Benayache, F., Benayache, S., Zama, D. (2019).** Hepatoprotective Effects of Algerian *Crataegus oxyacantha* Leaves. *JRecent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 10(1):70 – 75.
- Medjroubi, K., Benayache, F., Leon, F., Bermejo-Barrera J. (2003).** Complete assignment of the <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectra of two known guaianolides isolated from *Centaurea musimomum*. *Revista Colombiana de Quimica*, 32(1) : 17-22.

- Menvielle-Bourg, FJ. (2005).** Le superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie Springer*, 3(3):118-121.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Thioharidies, TC. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*, 52: 673-751.
- Minotti, G., Ronchi, R., Salvatorelli, E., Menna, P., Cairo, G. (2001).** Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res*, 61:8422-8428.
- Mobaraki, M., Faraji, A., Zare, M., Dolati, P., Ataei, M., Dehghan Manshadi, HR. (2017).** Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on the Major Side-effects of Doxorubicin. *Indian J Pharm Sci*, 79(3):335-344.
- Mohajeri, M., Sahebkar, A. (2018).** Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 122: 30-51.
- Mohamed, R., Karam, R., Hagrass, H., Amer, M., Abd El-Haleem, M. (2015).** Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Gene*, 561(1):107-114.
- Mohan, M., Bhandare, R. (2012).** Protective effect of *Solanum torvum* against testicular toxicity in male wistar rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3): 188-192.
- Mohand AY. (2006).** *Plantes médicinales de Kabylie (préface du docteur Jean-Philippe Brette)*. Paris. Ibis Press. (1 Ed).
- Morris C D, Carson S. (2003).** Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 139: 56–70.
- Narayana, KR., Reddy, MS., Chaluvadi, MR., Krishina, DR. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.
- Nasr, A. (2017).** The impact of aged garlic extract on adriamycin-induced testicular changes in adult male Wistar rats. *Acta Histochem*, 119(6):648-662.
- Nieto-Angel, R, Michal, WB., Betancourt-Olvera, M., Martínez-Solís, J. (2013).** Hawthorn (*Crataegus* spp.) as an ornamental plant. *Acta Hort*, 977(5):61-66.
- Noblanc, A. (2013).** Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique : apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases. Thèse de master en physiologie et génétique moléculaire. UNV Blaise Pascal -D'Auvergne : 253.

- Nowrouzi, F., Azadbakht, M., Kalehoei, E., Modarresi, M., (2019).** Protective Effect of Rosa Canina Extract Against Doxorubicin-induced Testicular Toxicity in Mice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62:1-18
- Odom, A., Hatwig, C., Stanley, J., Benson, A. (1992).** Biochemical determinant sminants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem. Pharmacol*, 43:831-836.
- Ola-Davies, OE., Oloye, AA., Oyeyemi, MO. (2015).** Ameliorating effects of guava (*Psidium Guajava*) extract on Adriamycin induced reproductive toxicities. *Folia Vetrinaria*, 59(3): 153-158.
- Olusoji, M J., Oyeyemi, O M., Asenuga, E R., Omobowale, T O., Ajayi, O L., Oyagbemi, A A. (2016).** Protective effect of Gallic acid on doxorubicin-induced testicular and epididymal toxicity. *Andrologia*, 49(4):1-10.
- Orhan, IE. (2018).** Phytochemical and Pharmacological Activity Profile of *Crataegus oxyacantha* L. (Hawthorn) - A Cardiotonic Herb. *Current Medicinal Chemistry*, 25:4854-4865.
- Ortiz, C., Caja, L., Sancho, P., Bertran, E., Fabregat, I. (2008).** Inhibition of the EGF receptor blocks autocrine growth and increases the cy-totoxic oxygen species production and glutathione depletion. *Biochem Pharmacol*, 75(10):1935-1945.
- Pandey, KB., Rizvi, SI. (2009).** Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5):270-278.
- Patel, A. P. (2017).** Anatomy and physiology of chronic scrotal pain. *Translational Andrology and Urology*. 6(1):51-56.
- Peterson, C., Trouet, A. (1978).** Transport and storage of daunorubicin and doxorubicin in cultured fibroblasts. *Cancer Res*, 38(12):4645-4649.
- Phillip, E. p. (2001).** Anatomy and physiology. New York. Hungry minds, inc. (1 Ed.)
- Pietta, PG. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63: 1035-1042
- Poitevin, B. (2014).** *Crataegus oxyacantha*. *La Revue d'Homéopathie* , 5:113–116.
- Powers, S., Jackson, M. (2008).** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev*, 88: 1243-1276.
- Prahalathan, C., Selvakumar, E., Varalakshmi, P. (2004).** Remedial effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid against Adriamycin induced testicular lipid peroxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2(1): 209–214.
- Prasad, AK., Pant, N., Srivastava, SC., Kumar, R., Srivastava, SP. (1995).** Effect of dermal application of hexachlorocyclohexane (HCH) on male reproductive system of rat. *Hum Exp Toxicol*, 14: 484–488.

- Quiles, J., Huertas, J., Battino, M., Mataix, J., Ramírez-Tortosa, M. (2002).**Antioxidant nutrients and Adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180(1):79-95.
- Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M., David, G. (1989).** Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res*, 24(2):127–134.
- Renu, K., Valsala, G.A. (2019).**Deciphering the molecular mechanism during doxorubicin-mediated oxidative stress, apoptosis through Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  in a rat testicular milieu. *Reprod Biol*, 19(1):22-37
- Ribreau-Gayon, D., (1968)** - Les composés phénoliques des végétaux. Paris. (Ed).
- Rice-Evans, C. (2004).** Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radic Biol Med*, 36: 827-828.
- Rizk, S., Zaki, H., Mina, M. (2014).** Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 67:176-186.
- Robert Z, H. (2016).** Superoxide in Biology and Medicine: An Overview. *ROS*, 1(2):99-109.
- Saalu, L.C., Osinubi, A.A., Oguntola, J.A., Adeneye, I.O., Benebo, A.S. (2010).**The delayed Testicular Morphologic Effects of Doxorubicin and the Rejuvenating Role of Grapefruit Seed Extract. *International Journal of Pharmacology*, 6 (3): 192-199.
- Sah, K. S., Khatiwada, S., Chaudhary, D. (2015).** Doxorubicin Induced Histomorphometric Changes in Testes of Albino Rats. *Nepal Journal of Biotechnology*, 3(1):10-14.
- Sehgal, R., Sehgal, A.H., (1984).** Effect of cadmium chloride on testicular activities in guppy *Lebistes reticulatus*. *Comp.Physiol. Ecol*, 9: 225-230.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. (1995).** Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes. *Free radical biology & medicine*, 19: 481-486.
- Salam, G.A., Allam, O.A.A. (2015).** The Effects of Valproic Acid on the Skeletal Development and the Ameliorative Effects of Combined Use of Folic Acid and Vitamin E in Pregnant Albino Rats. *International Journal of Clinical and Developmental Anatomy*, 1(3): 70-78.
- Salem, E.A., Salem, N.A., Hellstrom, W.J. (2016).** Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin-induced testicular toxicity in an experimental rat model. *Andrologia*, 49(1):1-7.
- Saltiel, E., Mcguire, W. (1983).**Doxorubicin (Adriamycin) cardiomyopathy. *Medical Progress*, 139(3):332-341.
- 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.

- Sanders, T., Scanlon, VC.(2007).**Essentials of Anatomy and Physiology. United States of America, New York. F.A. Davis Company. (5 Ed).
- Sayre, LM., Moreira, PI., Smith, MA., Perry, G.(2005).**Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Is Super Sanità*, 41(2):143-164.
- Schussler, M., Holzl, J. (1995).** Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species. *Arzneimittel-Forschung*, 45: 842–845.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, FK., (2006).**Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*, 67: 2058-2070.
- Shalizar Jalali, A., Hasanzadeh, S. (2013).***Crataegus monogyna* fruit aqueous extract as a protective agent against doxorubicin-induced reproductive toxicity in male rats. *Avicenna J Phytomed*, 3(2):159-170.
- Shalizar Jalali, AS., Hassanzadeh, S., Malekinejad, H. (2011).** Chemoprotective effect of *Crataegus monogyna* aqueous extract against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Veterinary Research Forum*, 2(4):266 – 273.
- Shanthi, S., Parasakthy, K., Deepalakshmi, PD., Devaraj, SN.(1994).** Hypolipidemic activity of tincture of *Crataegus* in rats. *Ind. J. Biochem. Biophys*, 31:143-146.
- Sherwood, L. (2008).** Human physiology: From cells to systems. Canada. cengage learning. (7 Ed).
- Sherwood, L. (2006).** Physiologie Humaine. Paris, Espagne, Bruxelles. Boeck & Larcier s.a. (2Ed.)
- Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., McManus, B., Liu, PP. (2011).**Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*, 36(4):296-305.
- Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. (2006).** Modern Nutrition in Health and Disease. Chicago. Lippincott Williams & Wilkins. (10Ed).
- Shouman, S., Noimi , F., Gashlan, H. (2006).**Evaluation of the potential protective effect of captopril against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J. Egypt. Soc. Toxicol*, 35:123-129.
- 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)*. San Diego, CA: Academic Press, 299: 152–78
- Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., Wojdylo, A. (2007).**Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, 103: 853-859.

- Sridevi, T., Nisha, PV. Appavu, AG. (2012).** Effect of Doxorubicin on the morphology, histology and karyology of male reproductive system of white mice, *Mus musculus*. *Indian J Sci Technol* , 5: 2614-2618.
- Svvs, R., Trivedi, P. P., Kushwaha, S., Vikram, A. (2013).**Protective role of atorvastatin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and testicular toxicity in mice. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(3):1-14.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R. (2013).** Doxorubicine: an update on anticancer molecular action toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 62(2):157-170.
- TALEB-SENOUCI, D., GHOMARI, H., KROUF, D., BOUDERBALA, S., PROST, J., LACAILLE-DUBOIS, MA., BOUCHENAK, M. (2009).**Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16(6-7): 623-631.
- Talent, Nadia a., Dickinsonab, Timothy A. (2005).**Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Revue canadienne de botanique*, 83(10):1268-1304.
- Thayer, W. (1988).**Evaluation of tissue indicators of oxidative stress in rats treated chronically with Adriamycin. *Biochem. Pharmacol*, 37(11):2189-2194.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussardb,, T., McLeod, H., Klein, T. E., Altman, R. B. (2011).** Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21(7): 440-446.
- Tirupathi Pichiah, P., Sankarganesh, A., Kalaiselvi, S., Indirani, K., Kamalakkannan, S., SankarGanesh, D., Achiraman, S. (2012).** Adriamycin induced spermatogenesis defect is due to the reduction in epididymal adipose tissue mass: A possible hypothesis. *Medical Hypotheses*, 78(2):218-220.
- Tokarska-Schlattner, M., Zaugg, M., Silva, R. d., Lucchinetti, E., Schaub, M., Wallimann, T. (2005).** Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(1):37-47.
- Tomascik-Cheeseman, LM., Coleman, MA., Marchetti, F., Nelson, DO., Kegelmeyer, LM., Nath, J., Wyrobek, AJ.(2004).** Differential basal expression of genes associated with stress response, damage control, and DNA repair among mouse tissues. *Mutat. Res*, 561: 1-14.
- Torres, VM., Simic, VD. (2012).** Doxorubicin-Induced Oxidative Injury of Cardiomyocytes - Do We Have Right Strategies for Prevention?In *Cardiotoxicity of oncologic treatments*. Fiuza M. InTech. (Ed).
- Traber M G, Atkinson J. (2007).**Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad Biol Med*, 43: 4-15.



- Tremblay, A. (2018).** Etude in Vitro de L'induction de Stress Oxydatif Par la Doxorubicine Dans Les Cellules de Sertoli Immatures et Les Spermatogonies. Thèse de master en sciences expérimentales de la santé. UNV du Québec: 151
- Trivedi, P., Tripathi, D., Jena, G. (2011).** Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: role of NFκB, p38 and caspase-3. *Food Chem Toxicol*, 49(4):838-847.
- Türedi, S., Yuluğ, E., Alver, A., Kutlu, Ö., Kahraman, C.(2015).** Effects of resveratrol on doxorubicin-induced testicular damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 67(3):229-235
- Uygur, R., Aktas, C., Tulubas, F., Uygur, E., Kanter, M., Erboğa, M., Caglar, V., Topcu, B., Ozen, O.A.(2013).** Protective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats. *Blackwell Verlag GmbH Andrologia*, 46: 917–926.
- Václavíková, R., Kondrová, E., Ehrlichová, M., Boumendjel, A., Kovár, J., Stopka, P., Soucek, P., Gut, I. (2008).** The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism. *Bioorg Med Chem*, 16(4):2034-2042.
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., Cetin, A., Otlu, A. (2009).** Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril*, 92(6):2028-2033.
- Verma, SK., Jain, V., Verma, D., Khamesra, R. (2007).** *Crataegus oxyacantha* a cardioprotective herb. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1(1):65-71.
- Vernet, P., Aitken, R.J., Drevet, J.R. (2004).** Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*, 216(1-2):31–39.
- Vijay, KM., Mahesh, V., Srinivas, P., Ganesh, YV., Godwin, AP., Lahkar, M. (2013).** Evaluation of the protective effect of silymarin on doxorubicin induced chronic testicular toxicity in rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1):473-484.
- Wallace, KB. (2003).** Doxorubicin-Induced Cardiac Mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology*, 93(3):105-115.
- Wang, H., Dong, Gao X., Zhou, GC. (2008).** In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem*, 106: 888-895.
- Wang, J., Mazza, G.(2002).** Effects of Anthocyanidins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem*, 50: 4183-4189.
- Wartenberg, M., Hoffmann, E., Schwindt, H., Grünheck, F., Petros, J., Arnold, J.R., Hescheler, J., Sauer, H. (2005).** Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumour spheroids. *FEBS Lett*, 579: 4541-4549.

- Xin, Y., You, Z., Gao, H., Zhou, G., Chen, Y., Yu, J., Xuan, Y. (2012).**Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides against doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Phytother Res.*, 26(5):716-721.
- Xu, X., Persson, H., Richardson, D. (2005).**Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol.*, 68(2):261-271.
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., Steven, H. (2014).**Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1845(1):84-89.
- Yeh, Y., Lai, H., Ting, C., Lee, W., Wang, L., Wang, K., Liu, T. (2007).**Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochem Pharmacol.*, 74(7):969-980.
- Yeh, Y., Liu, T., Wang, L., Lee, H., Ting, C., Lee, W., Lai, H. (2009).** A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol*, 156(1):48-61.
- Yoshikawa, M., Harada, E., Naitoh, Y., Inoue, K., Matsouda, H., Shimoda, H., Yamahara, J. Murakami, N., (1994).**Developpement of bioactive Function in Hydrangeae dulcis folium. III. On the antiallergic and antimicrobial Principles of Hydrangeae dulcis folium *Chem. Pharm. Bull*, 42(11): 2225-2230.
- Zelko, IN., Mariani, TJ., Folz, RJ. (2002).**Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 33(3): 337-49.
- Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Ho, WK., Chen, Z. (2001).**Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *J Nutr Biochem*, 12: 144-152.
- Zhongguo, Y. (1984).** Zhong Yao Zhi. Beijing: Ren min wei sheng chu ban she. (2Ed).
- Zini, A., de Lamirande, E., Gagnon, C. (1993).**Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase – like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*, 16(3):183–188.
- Zorniak, M., Szydlo, B., Krzeminski, TF. (2017).** Crataegus special extract WS 1442: up-to-date review of experimentl and clinical experiences.*J Physiol Pharmaco*, 68(4):521-526.
- Zunino, F., Gambetta, R., Di Marco, A., Zaccara, A.(1972).**Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. *Biochim.Biophys. Acta*, 277(3): 489-498.

**NOM ET PRENOM:** Belahcene Samia  
Derbal Ilhem  
Bouzahzah Ibtissem

**DATE DE SOUTENANCE :** 04/09/2019

**TITRE :** Évaluation de l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp vis-à-vis des dommages testiculaires induits par la doxorubicine chez les rats

**NATURE DU DIPLOME :** Master en Biologie animale  
**Option :** Toxicologie

**Résumé :**

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp (Rosacées) contre le stress oxydant induit par la doxorubicine au niveau des testicules des rats *Wistar albinos* en utilisant des paramètres biochimiques et histopathologiques.

Dans le but de tester le pouvoir antioxydant de cette plante *in vivo*, l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp (75 mg/kg) ou la vitamine E (100 mg/kg) a été administré par gavage pendant 10 jours, en combinaison avec un traitement par la DOX (15 mg/kg), administré par voie i.p dans le 8<sup>ème</sup> jour aux rats. Les animaux ont été sacrifiés et disséqués dans le 11<sup>ème</sup> jour. Un prélèvement testicules a été effectué, suivie par une homogénéisation afin d'évaluer la toxicité, en réalisant un dosage des paramètres du stress oxydatif : l'indicateur de la peroxydation lipidique (MDA), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion réduit (GSH).

La DOX agit essentiellement en provoquant un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant, qui se traduit par une augmentation importante du taux de MDA ainsi qu'une diminution significative du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx et CAT). Ce dysfonctionnement induit par la DOX a été également accompagné par des altérations et des changements de l'architecture des testicules, notamment la diminution du taux des spermatozoïdes, l'élargissement de l'espace inter-tubulaire, une congestion sanguine, nécrose cellulaire et interstitielle. En revanche, le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol de *Crataegus* sp et la Vit E a permis de rétablir les paramètres de stress oxydatif à la valeur normale et d'améliorer nettement le statut antioxydant ainsi que l'histologie du tissu testiculaire étudié.

Les tests *in vitro* (piégeage de radical DPPH et inhibition de LPO) de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus* sp ont révélé qu'il présente un pouvoir antioxydant très important ; ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux.

**Mots clés :** *Crataegus* sp, Doxorubicine, Stress oxydatif, Toxicité testiculaire, activités antioxydantes, les composés phénoliques.