



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Effet antioxydant et protecteur de *Centaurium sp* vis-à-vis la toxicité du cyclophosphamide

---

Présenté par : AYACHI Souad

Le : 12/06/2024

ADACI Issam

**Jury d'évaluation :**

**Président :** BOUBEKRI Nassima (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** AMRANI Amel (Pr- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur(s) :** KABOUCHE Sami (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire  
2023 - 2024**

# **REMERCIEMENT**

On tient tout d'abord à remercier en premier lieu Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour accomplir ce modeste travail.

Un grand merci à notre Encadreur Pr AMRANI AMEL qui a tout d'abord acceptée la conduite et la direction de notre mémoire, par son soutien, ses conseils et ses encouragements.

Nous tenons à remercier Mme Boubekri Nassima (MCA) de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également au membre du jury Mr Kabouche Sami (MCA) pour l'intérêt qu'il ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail .

Nous remerciant Mr Bahri Elaid de son aide durant la réalisation de notre mémoire, au niveau de l'animalerie et ses bons conseils.

# DÉDICACES

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage, la persistance et m'a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail à l'âme de ma chère mère, que Dieu bénisse son âme.

Je dédie ce modeste travail à mon Cher Père SAID qui m'a poussé à travailler et à réussir que Dieu te garde pour moi.

A mes chères sœurs Habiba, Radia, Massika, Loubna et Hind.

A mes frères Kader et sa femme Iméne, Rabeh et sa femme Hadjer et Billel.

A Mon Mari Sid Ali, je te remercie pour ta patience et ta compréhension.

A mes neveux et nièces : Abd Errahmene, Mohamed, Wadoud, Achouak, Mouiz, Ibtihel, Sadjed et Taha.

A mes chères amies : Asma, Souad et Karima, Merci pour votre aide et soutien.

A mes amies : Ikhlas, Amira , Soundous, Amina, Anfel, Houda, Salsabil

Merci d'être toujours là pour moi.

A tous les étudiants de la section Toxicologie 2023/2024.

**SOUAD**

## Résumé

*Centaurium* sp (*Gentianaceae*) est une plante médicinale utilisée en Algérie pour traiter le diabète, la douleur, la fièvre, l'inflammation et les maladies gastro-intestinales. Le cyclophosphamide (CPM) est un médicament antinéoplasique utilisé pour traiter de nombreux types de cancers ; malheureusement, son activité antitumorale associe des effets toxiques sur plusieurs organes dont le sang, les reins et le foie. Le mécanisme approprié de sa toxicité est associé à l'induction du stress oxydatif. Cette étude vise à déterminer l'effet protecteur de la vitamine E ou de l'extrait hydrométhanolique de la plante *Centaurium* sp contre les effets hématotoxiques, néphrotoxiques et hépatotoxiques induits par le CPM.

Notre étude expérimentale a été réalisée sur 25 rats mâles répartis en cinq groupes pendant 07 jours : Groupe 1 témoin. Groupe 2 traités par l'extrait de la plante *Centaurium* sp uniquement (300 mg/kg de poids corporel) par gavage pendant 06 jours. Groupe 3 traités par le CPM en dose unique (200 mg/kg de poids corporel) par injection intrapéritonéale le quatrième jour de l'expérience. Groupe 4 et 5 traité par la vitamine E (300 mg/kg de poids corporel) ou l'extrait de la plante *Centaurium* sp (300 mg/kg de poids corporel) par gavage pendant 06 jours avec injection du cyclophosphamide le quatrième jour.

Les résultats obtenus montrent que l'administration du CPM a provoqué un effet hématotoxique (anémie), hépatotoxique (augmentation de l'activité enzymatique des transaminases ALAT, ASAT, LDH et PAL), et néphrotoxique (augmentation des taux sériques de la créatinine et de l'urée). Le CPM a un effet globalement pro- oxydant, ceci est révélé par l'augmentation du taux de MDA (indice de la peroxydation lipidique) et la diminution du taux de glutathions réduit (GSH) dans les tissus hépatiques. En plus l'examen des coupes histologiques a montré une perte sévère de l'architecture hépatique.

Nos résultats montrent aussi, que la supplémentation en vitamine E ou en extrait de la plante *Centaurium* sp aux rats traités par le CPM a améliorée les perturbations des paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologiques et le statut antioxydant/oxydant et par conséquence atténuer l'intensité de la toxicité induite par le CPM. Les résultats de l'évaluation *in vitro* de l'effet piègeur des radicaux DPPH ont montré le pouvoir antioxydant de *Centaurium* sp. Ces résultats sont fortement corrélés avec les teneurs en phénols et flavonoïdes totaux.

**Mots clés :** Cyclophosphamide ; Stress oxydant ; Hépatotoxicité ; Hématotoxicité ; Vitamine E ; *Centaurium* sp ; Antioxydant.

## Abstract

*Centaurium sp* (Gentianaceae) is a medicinal herb, used in Algeria to treat diabetes, pain, fever, inflammation and gastrointestinal diseases. Cyclophosphamide (CPM) is an antineoplastic drug used to treat many types of cancers; unfortunately, its antitumor activity associates toxic effects on several organs including blood, kidney, and liver. The appropriate mechanism of its toxicity is associated with oxidative stress induction. Therefore, this study was conducted to assess the protective effect of vitamin E or the hydromethanolic extract of the plant *Centaurium sp* against the haematotoxic, nephrotoxic, and hepatotoxic effects induced by CPM.

Our experimental study was carried out on 25 male rats divided into five groups for 07 days: Group 1 control. Group 2 was treated with *Centaurium sp* plant extract only (300 mg/kg body weight) by gavage for 06 days. Group 3 was treated with CPM in a single dose (200 mg/kg body weight) by intraperitoneal injection on the fourth day of the experiment. Group 4 and 5 were treated with vitamin E (300 mg/kg of body weight) or extract of the *Centaurium sp* plant (300 mg/kg body weight) by gavage for 06 days with injection of CPM on the fourth day.

The results showed haematotoxic (anemia), hepatotoxic (a significant increase in the enzymatic activity of ALT, AST, LDH, and ALP), and nephrotoxic (increase in serum levels of creatinine and urea) effects after CPM injection. CPM has an overall pro-oxidant effect; this is revealed by the increase in the level of MDA (lipid peroxidation index) and the decrease in the level of reduced glutathiones (GSH) in liver tissues. In addition, examination of the histological sections showed a severe loss of hepatic architecture.

Our results also show that supplementation of vitamin E or *Centaurium sp* plant extract to rats treated with CPM improved the disturbances in the antioxidant/oxidant status and haematological, biochemical, and histopathological parameters and consequently reduced the intensity of CPM-induced toxicity. The results of the *in vitro* evaluation of the DPPH radical scavenging effect showed the antioxidant power of the hydromethanolic extract of *Centaurium sp*. These results were correlated with the total phenolic and flavonoid contents of this extract.

**Keywords:** Cyclophosphamide; Oxidative stress; Hepatotoxicity; Haematotoxicity; Vitamin E ; *Centaurium sp*; Antioxidant.

## الملخص

نبات *Gentianaceae) Centaurium sp* هو عشب طبي يستخدم في الجزائر لعلاج مرض السكري والألم والحمى والالتهابات وأمراض الجهاز الهضمي. سيكلوفوسفاميد (CPM) هو دواء مضاد للأورام يستخدم لعلاج العديد من أنواع السرطان. لسوء الحظ، يرتبط نشاطه المضاد للأورام بتأثيرات سامة على العديد من الأعضاء بما في ذلك الدم والكلى والكبد. ترتبط الآلية المناسبة لسميتها بتأثيرات الإجهاد التأكسدي. لذلك، أجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير الوقائي لفيتامين E أو المستخلص الهيدروميتانولي لنبات ضد التأثيرات السامة للدم والكلى والكبد الناجمة عن CPM.

أجريت دراستنا التجريبية على 25 جرد ذكر مقسمة إلى خمس مجموعات لمدة 07 أيام: المجموعة الأولى السيطرة. عولجت المجموعة الثانية بمستخلص نبات *Centaurium sp* فقط (300 ملغم/كغم من وزن الجسم) عن طريق التجريع لمدة 06 أيام. عولجت المجموعة 3 بـ CPM بجرعة وحيدة (200 ملغم/كغم من وزن الجسم) عن طريق الحقن داخل الصفاق في اليوم الرابع من التجربة. عولجت المجموعة 4 و 5 بفيتامين E (300 مجم / كجم من وزن الجسم) أو بمستخلص نبات *Centaurium sp* (300 مجم / كجم من وزن الجسم) عن طريق التجريع لمدة 06 أيام مع حقن CPM في اليوم الرابع.

أظهرت النتائج تأثيرات سامة للدم (فقر الدم) وسمية كبدية (زيادة كبيرة في النشاط الأنزيمي لـ ALT و AST و LDH و ALP) وسمية كلوية (زيادة مستويات الكرياتينين واليوريا في الدم) بعد حقن CPM له تأثير مؤكسد بشكل عام. ويتجلى ذلك من خلال الزيادة في مستوى MDA (مؤشر الأكسدة الفوقية الدهون) وانخفاض مستوى الجلوتاثيون (GSH) في أنسجة الكبد. بالإضافة إلى ذلك، أظهر فحص المقاطع النسيجية فقداناً شديداً في بنية الكبد.

تظهر النتائج أيضاً أن فيتامين E أو مستخلص نبات *Centaurium sp* أدت إلى تحسين الاختلال في العوامل المدروسة، والحد من شدة الإجهاد التأكسدي والسمية الناجمة عن CPM.

الكلمات المفتاحية : السيكلوفوسفاميد ؛ الإجهاد التأكسدي ، سمية الدم ، السمية الكبدية ، فيتامين E ، *Centaurium sp* ، مضاد للأكسدة.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A</b>	: Absorbance
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribo Nucléique
<b>ADP-ribose</b>	: Adénosine Diphosphate ribose
<b>AGPI</b>	: Acides gras polyinsaturés
<b>ALAT/GPT</b>	: Alanine aminotransférase
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	: Le chlorure d'aluminium
<b>AMM</b>	: Autorisation de Mise sur le Marché
<b>AP-1</b>	: Activateur de protéine-1
<b>ASAT/GOT</b>	: aspartate aminotransférase
<b>ATP</b>	: Adénosine Triphosphate
<b>BOOP</b>	: Bronchiolite Oblitérante avec Organisation Pneumonique
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de carbone
<b>CPM</b>	: Cyclophosphamide
<b>DL50</b>	: La dose létale 50
<b>DO</b>	: La densité optique
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	: Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
<b>DTNB</b>	: l'acide 5, 5'- dithiobis 2-nitrobenzoïque
<b>ERO</b>	: Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>EDTA</b>	: acide éthylène diamine tétra-acétique
<b>GAE</b>	: L'acide gallique
<b>GSH</b>	: Gluthation réduit
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Eau
<b>I%</b>	: Le pourcentage d'inhibition
<b>IC<sub>50</sub></b>	: La concentration inhibitrice médiane
<b>I-κB</b>	: Inhibiteur-Kappa B
<b>i.p</b>	: Intra-péritonéale
<b>KCl</b>	: le chlorure de potassium
<b>LGH</b>	: Lactate déshydrogénase
<b>M</b>	: molaire
<b>MDA</b>	: Le malondialdéhyde
<b>MeOH</b>	: Methanol
<b>N</b>	: Normalité
<b>NaClO</b>	: hypochlorite de sodium
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nicotinamide-Adenine Dinucleotide
<b>NADH<sub>2</sub></b>	: Dihyronicotinamide adenine dinucleotide
<b>NF-κB</b>	: Nuclear Factor-Kappa B
<b>NFS</b>	: Numération et formule sanguine.
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	: ion ammonium
<b>nm</b>	: Nanomètre
<b>NO</b>	: Monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	: Nitric Oxyde Synthase
<b>NVIC</b>	: Nausées et Vomissements Induits par la Chimiothérapie
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Ion superoxyde
<b>OCDE</b>	: Organisation de coopération et de développement économiques
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroxynitrite
<b>PAL</b>	: Phosphatase alcaline
<b>PARP</b>	: Poly (Adenosine diphosphate-Ribose) Polymerase
<b>pH</b>	: potentiel d'Hydrogène

<b>QE</b>	: La quercétine
<b>rpm</b>	: Rotation par minute
<b>SOD</b>	: Superoxyde Dismutase
<i>t</i>	: Test de student
<b>TBA</b>	: Acide thiobarbiturique
<b>TBARS</b>	: Thiobarbituric acid reactive substances
<b>TCA</b>	: Acide trichloroacétique
<b>TCP</b>	: Composés phénoliques totaux
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

## Listes des figures

<b>Figure 1:</b> Structure chimique de cyclophosphamide .....	3
<b>Figure 2:</b> Métabolisme du cyclophosphamide .Les voies d'inactivation sont représentées horizontalement et l'activation du cyclophosphamide verticalement .....	6
<b>Figure 3 :</b> Métabolisme du cyclophosphamide dans le foie .....	7
<b>Figure 4:</b> Bioactivation et voies métaboliques du cyclophosphamide .....	7
<b>Figure 5 :</b> Mécanisme d'action.....	8
<b>Figure 6:</b> Effet toxique de l'acroléine, qui est principalement responsable des toxicités cardiaque induites par le CPM .....	11
<b>Figure 7 :</b> Points indiquant l'effet possible d'un antioxydant (L'acide borique) sur la prévention de l'apoptose et du stress oxydatif induits par le CPM .....	13
<b>Figure 8 :</b> Mécanisme du cyclophosphamide dans l'induction de la néphrotoxicité .....	15
<b>Figure 9:</b> Voie proposée illustrant le mécanisme de la naringine (NG) dans la prévention de l'apoptose, de l'autophagie, de l'inflammation, du stress oxydatif et des dommages oxydatifs de l'ADN induits par le cyclophosphamide (CPM) .....	16
<b>Figure 10 :</b> L'effet cytotoxique du cyclophosphamide sur les poumons .....	19
<b>Figure 11</b> Les oxydants et les mécanismes de défense antioxydants impliquer dans la toxicité du cyclophosphamide. ....	21
<b>Figure 12 :</b> Toxicité de l'acroléine .....	22
<b>Figure 13:</b> <i>Centaurium erythraea</i> .....	26
<b>Figure 14:</b> Comparaison entre les 2 sous espèces <i>Centaurium erythraea</i> .....	27
<b>Figure 15:</b> <i>Centaurium pulchellum</i> (Sw.) Druce .....	29
<b>Figure 16:</b> <i>Centaurium tenuiflorum</i> .....	30
<b>Figure 17:</b> La structure de base des iridoïdes (cycle cyclopentane-(c)-pyrann .....	33
<b>Figure 18 :</b> Sécoiridoïdes caractéristiques des espèces de <i>Centaurium</i> . (a) Sweroside, (b) swertiamarin, et (c) gentiopicrin .....	33
<b>Figure 19:</b> Structure de base des xanthones .....	35
<b>Figure 20:</b> Xanthones caractéristiques des espèces de <i>Centaurium</i> . (a) Eustomin et (b) demethyleustomin .....	35
<b>Figure 21 :</b> La voie de biosynthèse possible des principaux flavonoïdes présents chez les espèces <i>Centaurium</i> . Les enzymes sont abrégées comme suit : CGT, C-glucosyltransférase ; CHI, chalcone isomère ase, CHS, chalcone synthase ; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H,.....	37
<b>Figure 22 :</b> Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH .....	40
<b>Figure 23 :</b> Préparation des cassettes des échantillons .....	46
<b>Figure 24 :</b> Etape de déshydratation .....	46
<b>Figure 25 :</b> Préparation des blocs .....	47
<b>Figure 26 :</b> Coupes histologiques après coloration.....	48
<b>Figure 27:</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres hématologiques. ....	52
<b>Figure 28 :</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le nombre total et différentiel de leucocytes. ....	53
<b>Figure 29 :</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le nombre des plaquettes. ....	54

<b>Figure 30:</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres hépatiques.....	55
<b>Figure 31:</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres rénaux.....	56
<b>Figure 32 :</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , de cyclophosphamide et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique des membranes des cellules hépatiques. ....	57
<b>Figure 33 :</b> Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> , le cyclophosphamide et la vitamine E sur la teneur en GSH des cellules hépatiques. ....	58
<b>Figure 34 :</b> Coupe histologique des rats témoins en utilisant une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). (A, B) représente l'histologie normale des rats témoins sans aucun changement (×400 ; ×100, respectivement). ....	59
<b>Figure 35 :</b> Modifications histopathologiques du foie des rats traité par le cyclophosphamide.....	60
<b>Figure 36 :</b> Coupes histologiques des rats traités par l'extrait de <i>Centaurium sp</i> Aspect normal ( x10 x40 respectivement) .....	61
<b>Figure 37 :</b> Coupes histologique des rat prétraités par vitamine E avec du cyclophosphamide( congestion + nécrose minimale x10 x40 respectivement).....	61
<b>Figure 38 :</b> Coupe histologique des rats prétraités par l'extrait avec cyclophosphamid (congestion et capillarisation des sinusoides x10, x40).....	61

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Données Taxonomiques de <i>Centaurium sp</i> .	24
<b>Tableau 2 :</b> Activité antiradicalaire d'extrait hydro methanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> et de la Vitamine E sur le radical libre DPPH.	50
<b>Tableau 3 :</b> Effets de l'extrait hydro méthanolique de la plante <i>Centaurium sp</i> et de la vitamine E sur les modifications histopathologiques provoqué par le cyclophosphamide au niveau du foie	59

## TABLE DES MATIERES

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**INTRODUCTION .....1**

**Partie I : Revue bibliographique.....**

**Chapitre I : Le cyclophosphamide.....**

1. Définition ..... 3

2. Pharmacocinétique .....4

2.1. Absorption .....4

2.2. Distribution .....4

2.3. Transport .....4

2.4. Excrétion .....4

2.5. Métabolisme .....5

3. Mécanismes d'actions biologiques .....8

4. Forme galénique et indications .....9

5. Mécanismes d'actions toxiques, effets indésirables et traitements.....9

prophylactiques et symptomatiques

5.1. Dommages sur les cellules en réplication .....9

5.2. Cardiotoxicité .....10

5.3. L'hépatotoxicité .....12

5.4. Néphrotoxicité .....14

5.5. Reprotoxicité .....16

5.6. Toxicité pulmonaire .....18

6. Cyclophosphamide et stress oxydatif .....19

## **Chapitre II : Le genre *Centaurium***

1. Historique .....	23
2. Description botanique du genre <i>Centaurium</i> .....	23
3. Taxonomie du genre <i>Centaurium</i> .....	<b>24</b>
4. Distribution géographique .....	<b>24</b>
5. Les espèces du genre <i>Centaurium</i> les plus rencontrées en Algérie .....	<b>25</b>
5.1. <i>Centaurium erythraea</i> Rafn .....	<b>25</b>
5.2. <i>Centaurium pulchellum</i> (Sw.) Druce .....	<b>28</b>
5.3. <i>Centaurium tenuiflorum</i> .....	<b>29</b>
6. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Centaurium</i> .....	<b>30</b>
7. La toxicité du genre <i>Centaurium</i> .....	30
8. Description phytochimique de <i>Centaurium</i> .....	32
8.1. Iridoides .....	32
8.2. Xanthone .....	34
8.3. Acides phénoliques.....	35
8.4. Les Flavonoïdes.....	36
8.5. Terpénoïdes.....	38
8.5.1. Monoterpénoïdes.....	38
8.6. Stérols.....	38
8.7. Coumarines.....	38

## **Partie II : Etude expérimentale**

<b>I. Matériel et Méthodes</b> .....	<b>39</b>
1. Matériel végétal .....	39
1.2. Préparation de l'extrait hydro- méthanolique .....	39
1.3. Dosage des métabolites secondaires .....	39
1.3.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TCP) .....	39
1.3.2. Dosage des flavonoïdes .....	40

1.4. Activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	40
1.4.1. Activité de piégeage du radical DPPH* .....	40
2. Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait .....	41
3. Potentiel thérapeutique de l'extrait hydro méthanolique de la plante Centaurium sp contre la toxicité hépatique, rénale et sanguine induites par le cyclophosphamide.....	42
3.1. Modèles animaux et conception expérimentale.....	42
3.2. Test biochimique pour les fonctions hépatiques et rénales.....	43
3.2.1. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT.....	43
3.2.2. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ALAT.....	43
3.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de LDH.....	43
3.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL).....	44
3.2.5. Dosage de l'urée plasmatique.....	44
3.2.6. Dosage de la créatinine plasmatique.....	44
3.3. Évaluation biochimique et mesure des paramètres de stress oxydatif.....	44
3.3.1. Préparation de l'homogénats.....	44
3.3.2. Dosage du MDA au niveau de l'homogénat hépatique.....	45
3.3.3. Dosage de glutathion réduit .....	45
4. Technique histologique.....	45
4.1. Fixation .....	45
4.2. Déshydratation .....	46
4.3. Inclusion et réalisation des blocs.....	47
4.4. Confection des coupes histologiques.....	47
4.5. Déparaffinage .....	47
4.6. Réhydratation .....	48
4.7. Coloration .....	48
<b>5. Etude statistique.....</b>	<b>49</b>

II. Les résultats.....	50
III. La discussion.....	62
<b>La conclusion.....</b>	<b>69</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>71</b>

# Introduction

### Introduction

La chimiothérapie utilise des médicaments cytotoxiques qui visent à éliminer les cellules cancéreuses, mais ils peuvent également endommager les cellules saines, ce qui entraîne des effets secondaires graves (**Kuzu et al., 2015**). Même si plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour la chimiothérapie, il reste encore des lacunes dans la compréhension de ses effets, car ces traitements peuvent influencer divers composants cellulaires, en particulier les protéines avec des fonctions spécifiques (**Prsa et al., 2020**).

Le cyclophosphamide (CPM) est largement utilisé en clinique pour son efficacité dans le traitement du cancer. Il est classé parmi les agents alkylants de la moutarde à l'azote (**Muluken et al., 2020**). Effectivement, le CPM est largement utilisé pour le traitement des maladies néoplasiques telles que les lymphomes et les tumeurs solides. De plus, il est également employé dans le traitement des maladies non néoplasiques telles que le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde (**Singh et al., 2018**).

Bien que le CPM soit très efficace, son utilisation clinique est limitée en raison de ses effets indésirables et de sa toxicité multi-organes. Ces effets indésirables comprennent notamment l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, la cardiotoxicité, l'urotoxicité, la tératogénicité, la neurotoxicité et l'immunotoxicité (**Zhai et al., 2018**). La toxicité associée au CPM est en effet liée à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation. Le stress oxydant se caractérise par une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène, connues pour jouer un rôle crucial dans l'initiation et l'induction de cette toxicité (**Caglayan et al., 2018**). Effectivement, le CPM perturbe également différentes voies de signalisation et induit l'apoptose, ou mort cellulaire programmée. Cela peut contribuer à ses effets thérapeutiques, mais aussi à ses effets indésirables (**temel et al., 2020**).

Ces dernières années, la chimioprévention et la chimioprotection par les composés phytochimiques ont attiré beaucoup d'attention et sont considérées comme une approche faisable, facilement applicable, acceptable et accessible pour lutter contre, régresser et gérer la progression du cancer, ainsi que pour améliorer les effets des traitements et protéger contre leurs toxicités. En effet, plusieurs composés phytochimiques font l'objet d'essais pour la chimioprévention des médicaments anticancéreux. Cela ouvre des perspectives intéressantes pour une approche plus holistique et moins toxique dans la lutte contre le cancer (**Catalano, 2016**).

Le genre *Centaurium*, particulièrement la petite centaurée (*Centaurium erythraea*), est une plante médicinale importante dans de nombreux pays, par ex. Algérie, Maroc, Italie, Espagne, Portugal et pays de la péninsule balkanique. Il est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies telles que le diabète, la fièvre, la rhinite, les maux d'estomac, les infections des voies urinaires, les troubles dyspeptiques, la perte d'appétit et les hémorroïdes, et comme diurétique. Il est également utilisé comme antiapoplectique, anticoagulant, anticholagogue, antipneumonique, hématocathartique et comme agent hypotenseur (Šiler & Mišić, 2016 ; El Menyiy et al., 2021). Les huiles essentielles et les extraits de *Centaurium sp* présentaient de nombreuses propriétés biologiques telles qu'agent antibactérien, antioxydant, antifongique, antileishmanien, anticancéreux, antidiabétique, anti-inflammatoire, insecticide, diurétique, gastroprotecteur, hépatoprotecteur, dermatoprotecteur, neuroprotecteur et inhibiteur du développement larvaire. La caractérisation phytochimique de *Centaurium sp* a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires tels que les xanthonoïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les acides gras (Šiler & Mišić, 2016 ; El Menyiy et al., 2021).

Compte tenu de effets antioxydant et hépatoprotecteur de genre *Centaurium*, s'inscrit nos recherches utilisant divers tests toxicologique et pharmacologiques *in vivo* et *in vitro* pour valider son utilisation traditionnelle et valider l'innocuité et l'efficacité de *Centaurium sp* et de son contenu bioactif.

Cette étude est subdivisée en deux parties essentielles :

La première partie présente une synthèse bibliographique dans laquelle nous apportons un premier chapitre qui consiste à présenter la pharmacocinétique du CPM et sa toxicité, ainsi que le deuxième chapitre est une présentation des aspects botaniques, chimiques et biologiques du genre *Centaurium sp*.

La deuxième partie expérimentale dans ce mémoire, consiste à analyser les effets antioxydants et modulateurs de la supplémentation en vitamine E (antioxydant standard) ou en extrait hydrométhanolique de la plante *Centaurium sp* sur la toxicité induite par le CPM au niveau du foie, du sang des rats *Wistar albinos*. L'influence des différents traitements a été analysés par : L'évaluation des paramètres sanguins (FNS), certains paramètres biochimiques, l'exploration du profil du stress oxydant hépatique et l'étude histopathologique du foie. Et enfin, nous discuterons l'ensemble de résultats obtenus dans ce manuscrit, et on suggère quelques perspectives à ce travail de recherche.

**Partie I :**  
**Revue bibliographique**

# **Chapitre I :**

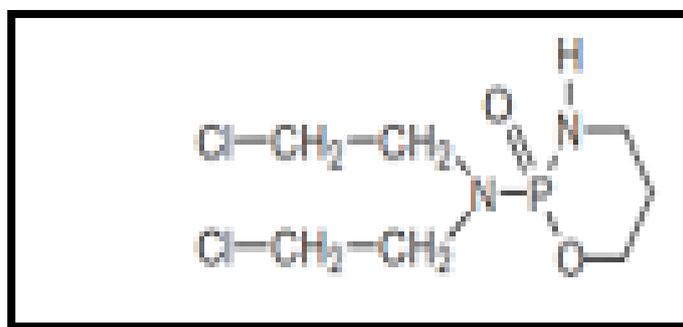
# **Le cyclophosphamide**

## Le cyclophosphamide

### 1. Définition

Le cyclophosphamide (CPM) est un agent anticancéreux alkylant qui a été caractérisé pour la première fois lors d'expériences sur des tumeurs de rat en 1954 par Friedman et Seligman suivie de sa commercialisation en 1959 par les Laboratoires Asta Medica puis par Baxter Oncology sous le nom d'Endoxan® (**Friedman & Seligman 1976**).

Il s'agit d'un promédicament inactif qui nécessite une bioactivation enzymatique pour manifester une activité cytostatique (Dejong & al, 2005) il ajoute un groupe alkyle à la base guanine de l'ADN, ce qui entraîne la synthèse de couples aberrants cytosine-thymine obligeant le système de réparation de l'ADN des cellules à éliminer la guanine modifiée, déclenchant ainsi l'apoptose cellulaire (**Matalon et al., 2004 ; Patti & Lo Fermo, 2011 ; Altayli et al, 2012**). C'est une moutarde azotée à substitution oxazaphosphorine, à forte activité cytotoxique et immunosuppressive. Le cyclophosphamide est un médicament essentiel et polyvalent utilisé dans de nombreux contextes cliniques. Il joue un rôle central dans les schémas de préparation à la transplantation d'organes en raison de ses propriétés immunosuppressives. De plus, il est largement utilisé comme agent anticancéreux dans le traitement de divers types de cancer, notamment la maladie de Hodgkin, le lymphome non hodgkinien, la leucémie, la polyarthrite rhumatoïde, le lymphome de Burkitt, le lupus érythémateux, la sclérose en plaques, le neuroblastome, le myélome multiple, le cancer de l'endomètre, le cancer du sein et le cancer du poumon. Son utilisation généralisée dans la pratique clinique témoigne de son efficacité dans le traitement de nombreuses affections médicales (**Muluken et al., 2020**).



**Figure 1:** Structure chimique de cyclophosphamide (Ekhart et al., 2008).

## 2. Pharmacocinétique

### 2.1. Absorption

Le cyclophosphamide (CPM) est une molécule bien absorbée, après administration orale, sa biodisponibilité est de plus de 75% et les concentrations plasmatiques maximum en métabolites sont atteintes après 2 à 3 heures après l'injection d'une dose en intraveineuse. La demi-vie du composé est de 3 à 12 heures et 5% à 25% de la dose administrée est retrouvée sous une forme inchangées dans les urines (**Baxter, 2013**).

### 2.2. Distribution

Après administration orale ou intraveineuse, le cyclophosphamide est rapidement distribué dans tout le corps avec une liaison aux protéines plasmatiques allant de 0 % à 30 %, tandis que la capacité de liaison aux protéines est plus élevée pour son métabolite, le 4-hydroxycyclophosphamide (4-OHCP) (< 67 %) (Moore, 1991). Le CPM a un volume de distribution de 30-50 L (**De Jong, 2005**). Plusieurs études ont suggéré que le CPM peut entrer dans le liquide céphalorachidien par la barrière hémato-encéphalique (BHE) alors que la pénétration de ces métabolites actifs dans le cerveau est limitée en raison de leur polarité accrue et leur forte fixation aux protéines plasmatique (**Zhang et al., 2006**).

### 2.3. Transport

Le 4-OHCP (4-hydroxycyclophosphamide) et l'acroléine démontrent une capacité notable à traverser la membrane cellulaire par diffusion passive in vitro. En revanche, le cyclophosphamide, en raison de sa nature hydrophile, ne présente pas une facilité similaire de passage à travers la bicouche lipidique des cellules et requiert donc un transport médié par un processus de diffusion facilitée. De manière analogue, la moutarde au phosphoramidate, caractérisée par une charge négative à un pKa de 4,5-4,8 au pH physiologique, présente une affinité réduite pour la traversée membranaire, nécessitant potentiellement des transporteurs spécialisés ou des mécanismes de diffusion assistée pour une pénétration efficace dans les cellules (**Qiu et al, 2004**).

### 2.4. Excrétion

Le cyclophosphamide est principalement excrété dans l'urine sous forme de métabolites et dans une moindre mesure, dans les fèces et l'air expiré avec une demi-vie de 5 h à 9 h (**Dejong et al., 2005**). et de 3 h à 12 h selon (**Boddy & Yule, 2000**) le principal

métabolite retrouvé dans l'urine est le carboxyphosphamide. Il a été constaté que le conjugué GSH d'imino-cyclophosphamide est activement excrété dans la bile via la protéine MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2) (Qiu et al., 2004).

## 2.5. Métabolisme

Les cytochromes P450 de la famille 2B notamment les cytochromes CYP2B6, CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 et CYP3A5 sont impliqués dans cette étape d'activation avec la plus forte contribution du CYP2B6 et du CYP3A4 qui sont les isoformes les plus impliquées dans l'activation du cyclophosphamide (CPM) en métabolites cytotoxiques ayant une activité antitumorale. (Ekhart et al., 2008).

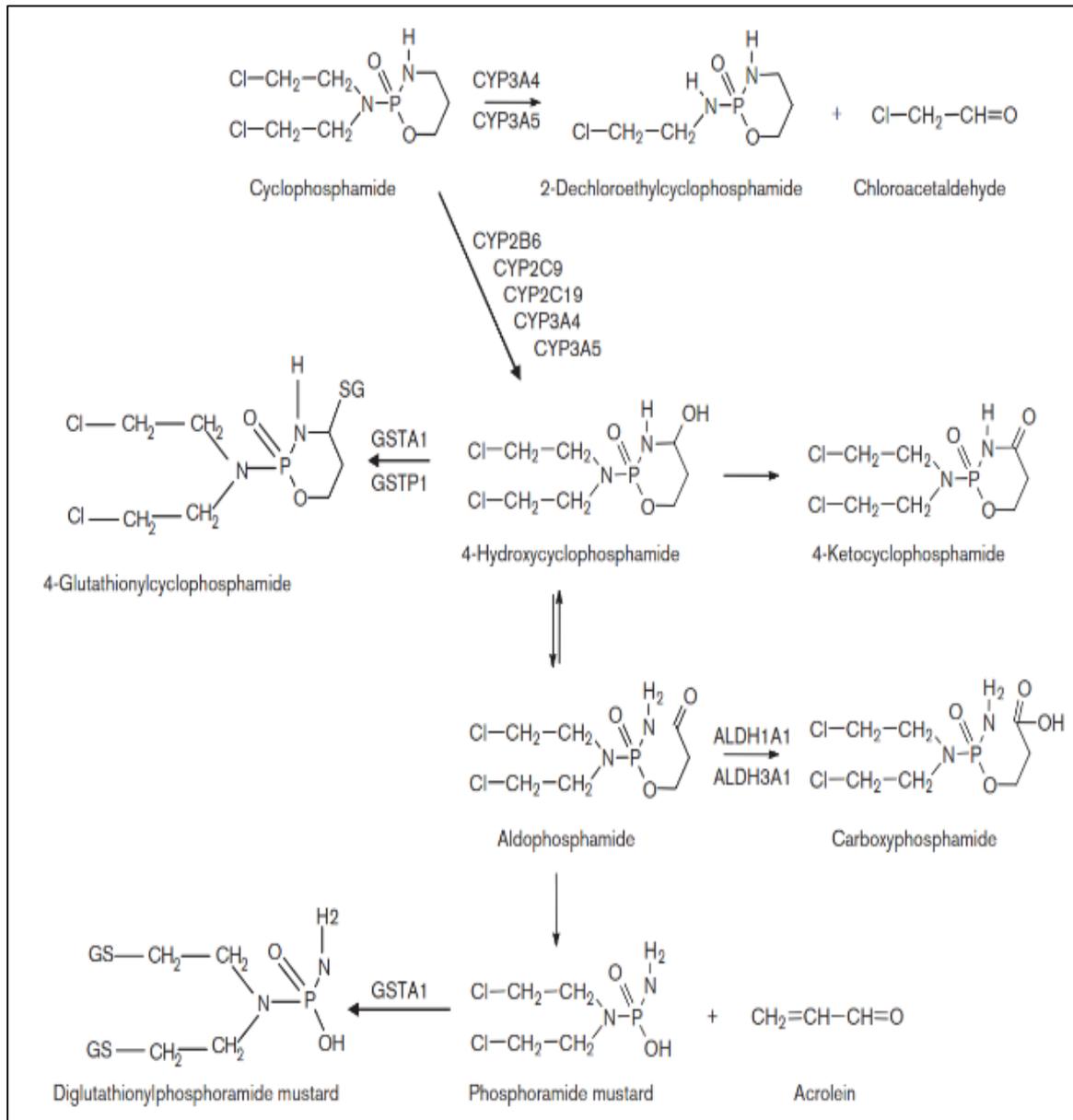
Le cyclophosphamide subit une hydroxylation en position C-4 et forme le 4-OHCP, qui est en équilibre dynamique avec son tautomère à anneau ouvert, l'aldophosphamide. Ces deux métabolites se diffusent facilement dans les cellules mais ne sont pas cytotoxiques. L'aldophosphamide est converti en deux métabolites toxiques, la moutarde phosphoramide et l'acroléine par un processus chimique appelé  $\beta$ -élimination (Mahipal & Pawar, 2017).

La moutarde phosphoramide est un agent actif responsable de l'activité antinéoplasique et l'acroléine est un métabolite toxique (Iqbal et al., 2019). La moutarde phosphoramide forme un cation aziridinium cyclique hautement réactif, qui peut réagir avec le N-7 de la guanine fortement nucléophile et avec la cytidine de l'ADN. En raison des deux fractions réactives dans la molécule, des réticulations intrastrand et interstrand peuvent se former (Ahlmann & Hempel, 2016). Cela conduit à une inhibition de la réplication d'ADN et à l'apoptose. L'acroléine, un métabolite hautement réactif, a une courte demi-vie biologique et déclenche la production des espèces réactif de l'oxygène (ERO) (Moghe et al., 2015).

L'aldophosphamide, peut aussi être métabolisé et détoxifié par les enzymes ALDH (Aldehyde Dehydrogenase) ; ALDH1A1 et ALDH3A1 en composé carboxyphosphamide inactif (Sladek, 1999).

Le CPM peut également être métabolisé, par une voie mineure impliquant le CYP3A4, en déchloroéthyl qui est inactif et en chloroacétaldéhyde qui est responsable d'effets toxiques sur le système nerveux et l'appareil urinaire. Le 4-OH-CPA peut être désactivé par l'aldéhyde déshydrogénase en carboxyphosphamide qui n'a aucune activité anticancéreuse. Il a été montré sur des lignées tumorales humaines, qu'une surexpression de l'ALDH

était synonyme d'une plus faible sensibilité au CPA. Le 4-OH-CP est détecté par l'intermédiaire des Glutathione-S -Transférases (GST) (Touati, 2013).



**Figure 2:** Métabolisme du cyclophosphamide .Les voies d'inactivation sont représentées horizontalement et l'activation du cyclophosphamide verticalement (Ekhart et al., 2008).

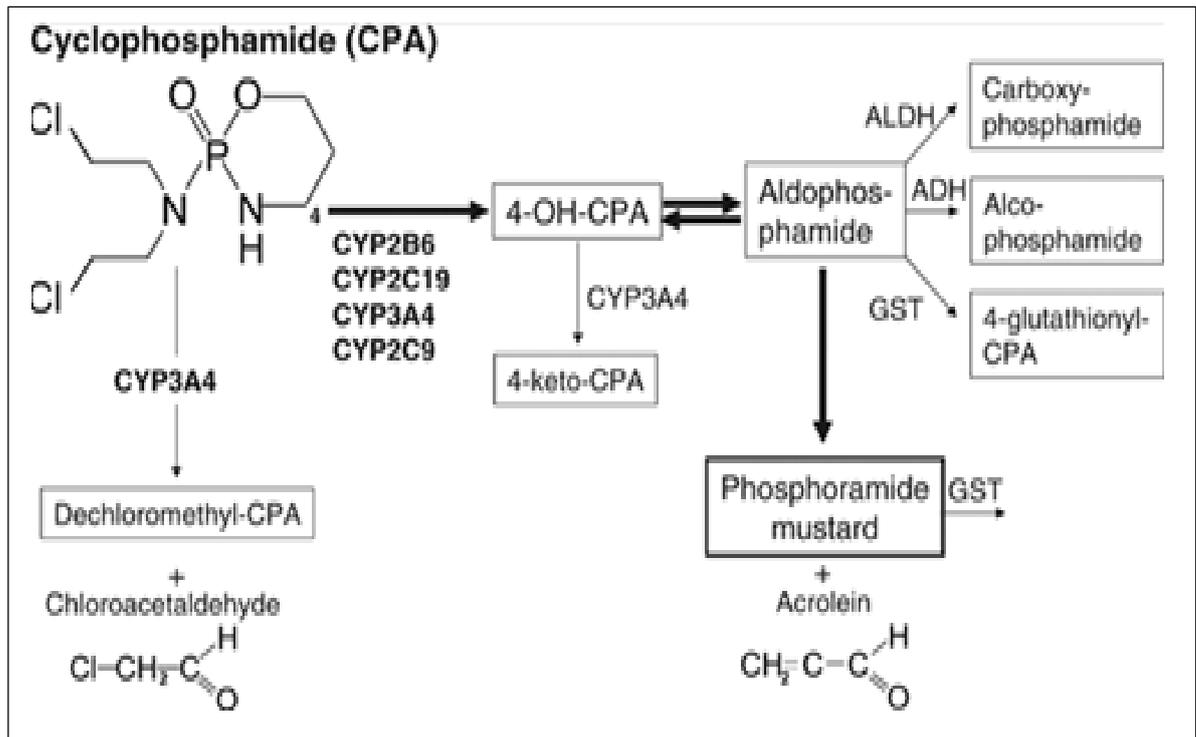


Figure 3: Métabolisme du cyclophosphamide dans le foie (Lenglet, 2010)

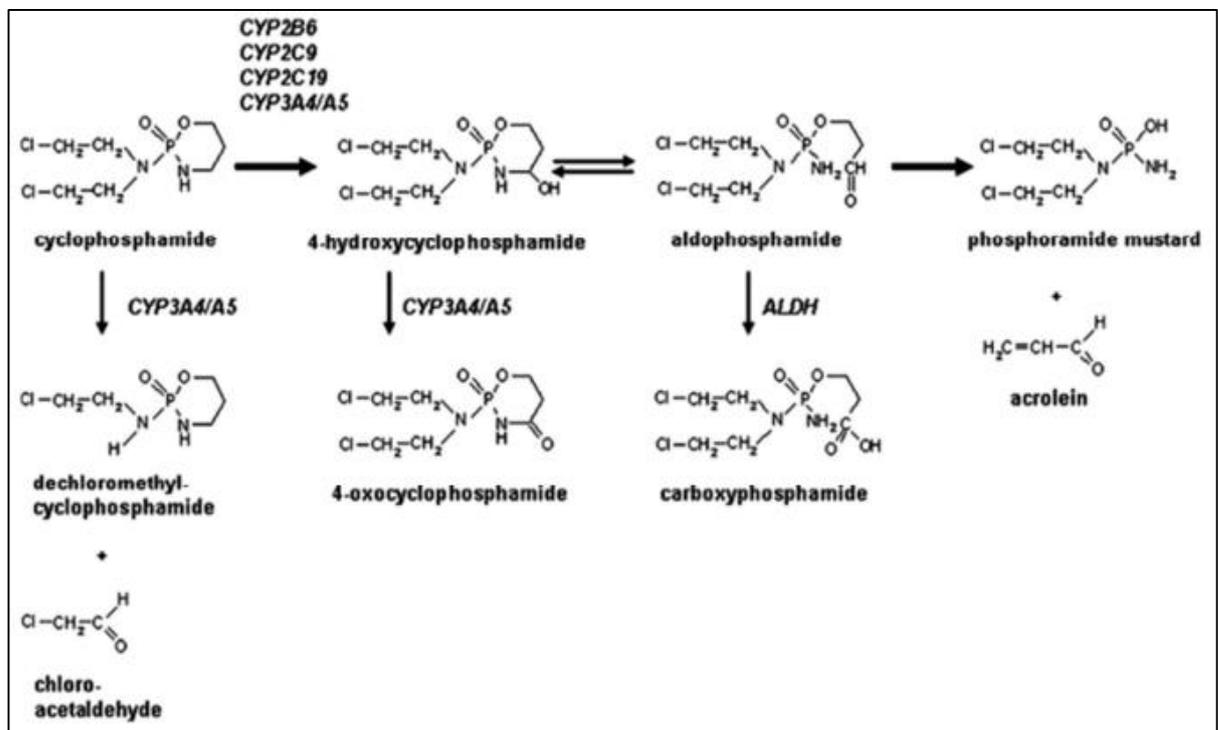
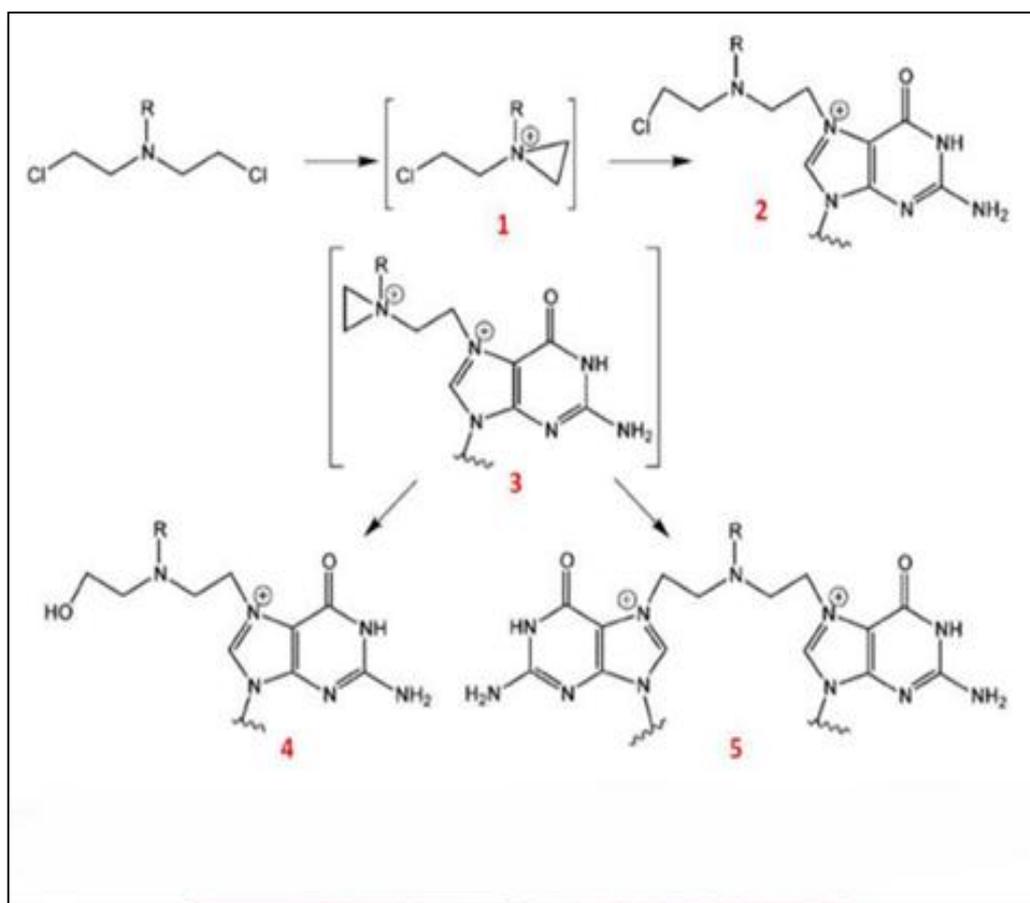


Figure 4: Bioactivation et voies métaboliques du cyclophosphamide (Lenglet, 2010)

### 3. Mécanismes d'actions biologiques

C'est l'ion aziridinium qui peut réagir avec de nombreux composés nucléophiles dans l'organisme et qui est à l'origine des propriétés anticancéreuses. Il agit au niveau de l'ADN des cellules en réplication, pendant la phase S quand les deux brins sont séparés. En effet, l'ion aziridinium électrophile (1), peut induire une alkylation sur un brin d'ADN libre (2). Cette alkylation forme une liaison covalente entre la moutarde et l'ADN et régénère le doublet d'électrons libres sur l'azote de la molécule (3). L'ion aziridinium va alors pouvoir être reformé par la même réaction sur l'autre chaîne de carbone, et sera en mesure de se lier à un autre brin d'ADN (5). Ces deux alkylations des brins ont lieu en général sur l'azote en position 7 des guanines et entraînent une liaison inter ou intra brin. Dans d'autres cas, l'ion aziridinium peut s'hydroxyler et donc s'inactiver (4) (Lenglet, 2010).



**Figure 5:** Mécanisme d'action biologique.

(1) Formation de l'ion aziridinium, (2) Attaque de l'ADN, (3) formation du deuxième ion aziridinium et (4) Hydroxylation ou (5) Fixation à un autre brin d'ADN de la molécule.

#### 4. Forme galénique et indications

Le cyclophosphamide destiné à la voie orale obtient son AMM la première fois en avril 1960. La molécule est administrée par voie orale et injectable. Elle est utilisée dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires à petites cellules, des cancers du sein, du testicule, de la vessie, de l'ovaire, mais aussi dans le traitement des neuroblastomes, des sarcomes, des leucémies aiguës lymphoïdes, des lymphomes malins non hodgkiniens, des lymphomes hodgkiniens, des myélomes multiples. Le cyclophosphamide est aussi utilisé à des plus faibles doses dans la prise en charge des granulomatoses de Wegener, des lupus érythémateux aigus disséminés sévères, des néphropathies auto-immunes cortico-résistantes, de certains cas de polyarthrite rhumatoïde et dans le conditionnement des allo- et autogreffes de moelle (**Has, 2016**).

#### 5. Mécanismes d'actions toxiques, effets indésirables et traitements prophylactiques et symptomatiques

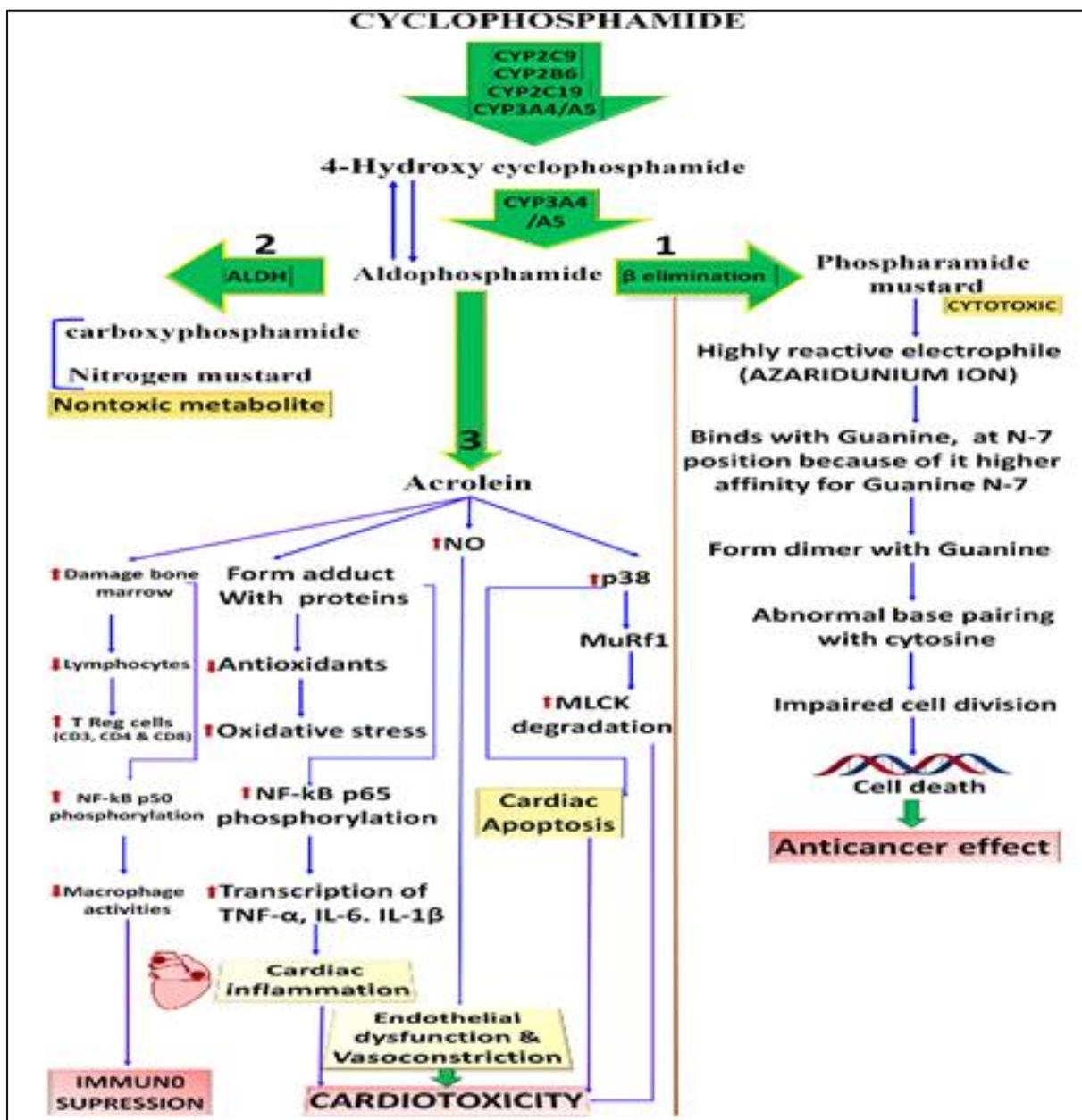
C'est à la fois le mode d'activation de la molécule et son mode d'action qui vont entraîner l'apparition d'effets indésirables. Le CPM cible de façon non sélective toutes les cellules à renouvellement rapide, que celles-ci soient tumorales ou non. C'est pourquoi on observe chez les patients recevant ce traitement des effets toxiques sur les cellules sanguines, les cellules des follicules pileux, ou encore sur le cœur, les voies urinaires, les organes reproducteurs, etc (**Baxter, 2019**).

##### 5.1. Dommages sur les cellules en réplication

Le CPM, en s'attaquant aux cellules en réplication, va toucher celles qui composent les follicules pileux, qui se renouvellent toutes les 12 à 24 heures. Les premiers signes de fragilité et de chute des poils et cheveux apparaissent généralement entre 15 et 20 jours après que le patient ait débuté le traitement. Ils commencent à repousser environ un mois après la dernière prise de CPM (**Carmagnac et al., 2015**). Les lignées sanguines étant des cellules à renouvellement rapide, la molécule est donc aussi susceptible d'entraîner une myélosuppression, mise en évidence par une anémie, une baisse de la numération des leucocytes, et avec moins d'ampleur, des thrombocytes. Le principal signe de cette myélotoxicité, et donc le paramètre primordial à surveiller, est la leucopénie, c'est cette perturbation qui a le plus de chances de s'avérer sévère (**Baxter, 2019**).

## 5.2. Cardiotoxicité

Le cyclophosphamide administré à très fortes doses est associé à une toxicité cardiaque aiguë. Une diminution réversible de la fonction systolique a été démontrée chez >50% des patients ayant reçu de fortes doses de cyclophosphamide. À des doses >1,55 g/m<sup>2</sup>/jour, une insuffisance cardiaque irréversible s'est produite chez 25 % des patients. La physiopathologie des dommages cardiaques induits par le CPM est mal comprise, bien que ses métabolites soient censés induire un stress oxydatif et des dommages capillaires endothéliaux directs avec une extravasation résultante de protéines, d'érythrocytes et de métabolites toxiques. En présence de métabolites toxiques, la dégradation des cellules endothéliales contribue à endommager directement le Myocarde et les vaisseaux sanguins capillaires entraînant un œdème, une hémorragie interstitielle et la formation de microthromboses. Les cellules endothéliales sont plus sensibles aux dommages induits par le CPM que les autres cellules ; cela pourrait être associé à leur taux de prolifération élevé ; La génération d'espèces réactives de l'oxygène induite par le CPM peut également conduire à une réduction de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique, conduisant ainsi à une fonction endothéliale compromise. Les mécanismes moléculaires des dommages cardiaques induits par le CPM sont actuellement postulés (Figure 6), ce qui pourrait conduire à de meilleures stratégies préventives pour traiter la cardiotoxicité (**Muluken et al., 2020**). En outre, il a été démontré que le glutathion joue un rôle protecteur important dans la toxicité des cellules cardiaques. L'épuisement cellulaire de la teneur en glutathion a été corrélé à une augmentation de la toxicité des cellules cardiaques induite par le 4-hydroxycyclophosphamide. La déplétion en glutathion produite par l'acroléine pourrait donc expliquer la cardiotoxicité du cyclophosphamide (**Kurauchi et al., 2017**).



**Figure 6:** Effet toxique de l'acroléine, qui est principalement responsable des toxicités cardiaque induites par le CPM (Iqbal et al., 2019).

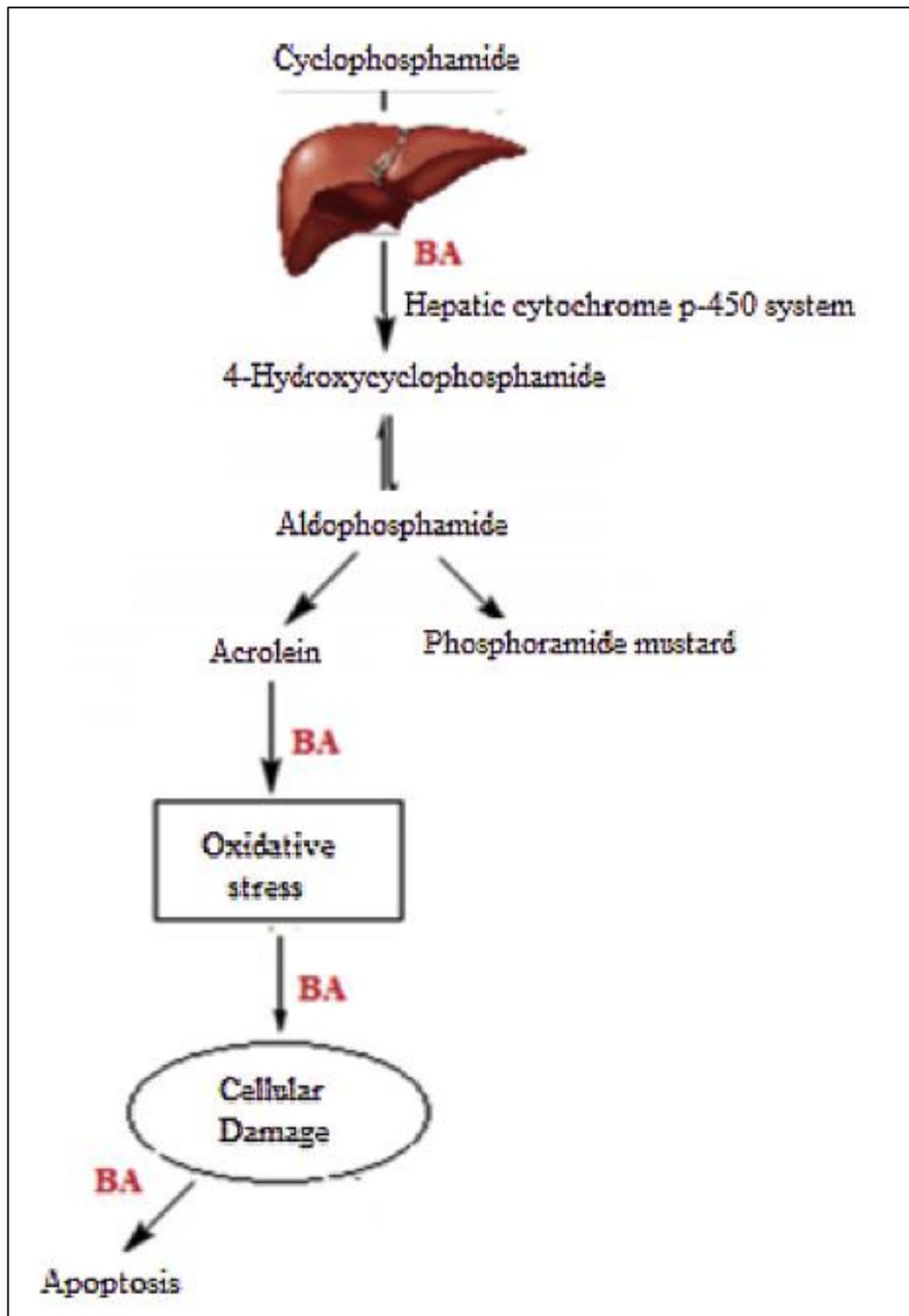
Le CPM subit un métabolisme hépatique qui aboutit à la production d'acroléine, un métabolite toxique qui agit sur le myocarde et les cellules endothéliales. Le CPM est responsable de l'altération du pool énergétique des cardiomyocytes en affectant les protéines de liaison aux acides gras cardiaques (H-FABP). Le CPM a été associée à l'apoptose des cardiomyocytes, à l'inflammation, au dysfonctionnement endothélial, à la dérégulation du calcium, aux lésions du réticulum endoplasmique et aux lésions mitochondriales. Le CPM est responsables de la cardiotoxicité en raison de l'épuisement des niveaux d'antioxydants/ATP, d'une altération de la contractilité, d'un endothélium endommagé et d'une augmentation des activités pro-inflammatoires/pro-apoptotiques entraînant une cardiomyopathie, un infarctus du myocarde et des problèmes cardiaques. L'ajustement de la dose, l'élimination/excrétion de l'acroléine et le maintien du pool d'antioxydants endogènes pourraient être l'approche thérapeutique pour atténuer les toxicités

### 5.3. L'hépatotoxicité

La toxicité hépatique représente une préoccupation majeure associée à l'utilisation du cyclophosphamide. Ce médicament est reconnu pour ses effets indésirables prononcés sur le foie, principalement attribuables à des réactions oxydatives et inflammatoires (**Nafees et al., 2012**). Ces processus pathologiques peuvent induire des lésions hépatiques substantielles, compromettant ainsi la fonction hépatique normale. (**Shokrzadeh et al., 2015**).

Le métabolisme du cyclophosphamide, catalysé par les enzymes hépatiques telles que les cytochromes CYP3A4, CYP2C9 et CYP2B6, conduit à une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) dans le foie. Ce NO peut réagir avec les anions superoxydes pour former du peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), un oxydant biologique puissant, perturbant les fonctions mitochondriales et cellulaires et favorisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO peuvent interagir avec divers constituants cellulaires, induisant notamment la peroxydation lipidique et des cassures de l'ADN par altération des bases puriques et pyrimidiques. Notamment, le principal métabolite du cyclophosphamide, le 4-hydroxycyclophosphamide (4-OHCP), est impliqué dans la promotion de la peroxydation lipidique dans divers tissus, dont le foie (**Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003**).

Les études de **Cengiz et al., (2019)** ont démontré que la CPM peut induire un stress oxydatif tout en déclenchant l'apoptose et des lésions hépatiques chez le rat. Les lésions des tissus hépatiques induites expérimentalement ont été causées par des lésions de la membrane induites par les métabolites du CPM. Ces changements pathologiques dans les résultats concordent avec l'élévation des taux d'enzymes sériques. L'acide borique (BA) pourrait empêcher tous ces effets toxiques indésirables du CPM. Les effets antioxydants du BA pourraient faire partie de son mécanisme de protection contre l'apoptose et le stress oxydatif induits par le CPM (Figure 7). Les résultats de cette étude pourraient fournir une application potentielle de BA combinée à la CPM pour réduire les effets indésirables du traitement du cancer.



**Figure 7:** Points indiquant l'effet possible d'un antioxydant (L'acide borique) sur la prévention de l'apoptose et du stress oxydatif induits par le CPM (Cengiz et al., 2019).

## 5.4. Néphrotoxicité

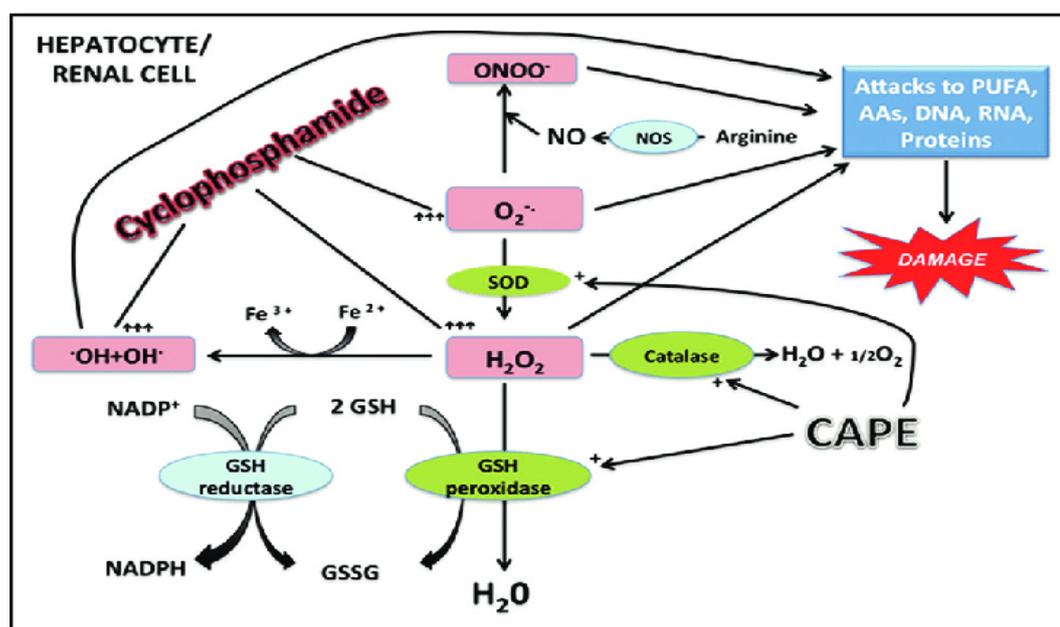
L'hyponatrémie est le trouble le plus fréquemment rencontré lors de l'utilisation du cyclophosphamide, surtout avec des doses élevées par voie intraveineuse (30 à 50 mg/kg ou 6 g/m<sup>2</sup>). L'hyponatrémie est due à une hyperstimulation de l'hormone antidiurétique (syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique ou SIADH) altérant la capacité du rein à excréter l'eau (**Bode et al., 1980**). Les nausées induites par la chimiothérapie peuvent également jouer un rôle contributif, car les nausées sont un puissant stimulant de la libération de l'hormone antidiurétique. Ceci est également favorisé par les protocoles de réhydratation des patients en prévention de la cystite hémorragique (**Bressler, 1985**). La nécessité d'une réduction de la dose de cyclophosphamide chez les patients présentant une insuffisance rénale pré-existante est controversée. L'adaptation de la dose n'est pas recommandée par plusieurs auteurs citant le manque d'association entre la fonction rénale et la clairance du cyclophosphamide ou la toxicité hématologique (**Kintzel et al., 1995**). En revanche, d'autres suggèrent la nécessité d'un ajustement de la dose en raison de la modification de la pharmacocinétique lors de l'insuffisance rénale (**Golightly et al., 2013**). Le cyclophosphamide est modérément hémodialysable, il est préférable de l'administrer après la séance d'hémodialyse. Chez les patients en dialyse péritonéale, certains auteurs suggèrent une réduction de dose de 25 % (**Saif et al., 2009**).

Le cyclophosphamide est associé à l'induction de diverses complications rénales, telles que la nécrose tubulaire, la fibrose tubulaire, la congestion au niveau du glomérule et l'inflammation, qui peuvent entraîner un dysfonctionnement rénal significatif. Ces effets contribuent à la toxicité rénale du médicament et peuvent nécessiter une surveillance étroite et des mesures de gestion appropriées lors de son utilisation en clinique (**Singh et al., 2014**).

En effet, le cyclophosphamide entraîne une augmentation des niveaux de créatinine sérique et d'azote uréique sanguin, qui sont deux indices typiques utilisés pour évaluer la fonction rénale et la stabilité structurale rénale. Cette augmentation peut être attribuée aux lésions induites dans les tubules rénaux, comme en témoignent les modifications marquées observées au niveau des tissus rénaux lors de l'analyse histopathologique (**Sadeghi et al., 2017**).

Le cyclophosphamide induit également le stress oxydant et l'inflammation du tissu rénal. Chez les souris Swiss albinos mâles, l'injection de cyclophosphamide à une dose de 200 mg/kg par voie intrapéritonéale entraîne un stress oxydant en augmentant les niveaux de MDA (malondialdéhyde). Le cyclophosphamide entraîne une production accrue de radicaux libres, qui sont des espèces réactives de l'oxygène. Ces radicaux libres peuvent attaquer les lipides

constituant les membranes cellulaires, entraînant ainsi des changements graves dans leur structure et leur fonction. Ces altérations membranaires peuvent contribuer aux dommages tissulaires en diminuant les niveaux de GSH (glutathion réduit) et l'activité des enzymes antioxydantes CAT (catalase) et SOD (superoxyde dismutase) dans ces tissus (Sadeghi et al., 2017, Mahmoud et al., 2017), cette diminution des activités enzymatiques de la SOD, de la CAT et de la GPx (Glutathione Peroxidase) est en effet associée à un stress oxydant accru (Figure 8). Ce stress oxydant peut induire l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et augmenter les lésions tissulaires en favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. De plus, l'activité des enzymes iNOS (inductible Nitric Oxide Synthase) et de la COX-2 (Cyclooxygenase-2), deux agents inflammatoires majeurs régulant le processus inflammatoire, peut également augmenter (Temel et al., 2020).

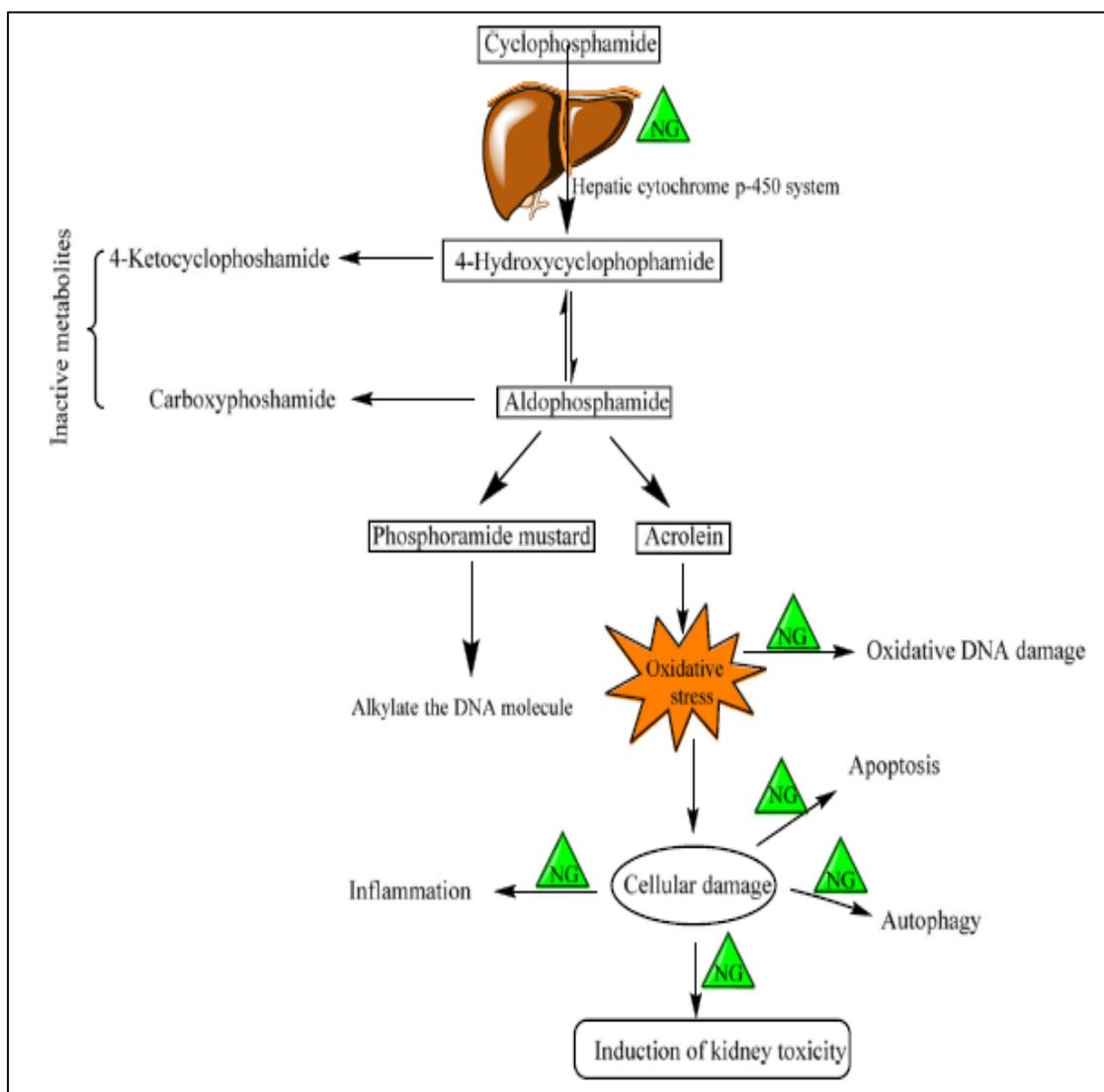


**Figure 8:** Mécanisme du cyclophosphamide dans l'induction de la néphrotoxicité (Akyol et al., 2016)

AAs : Acides aminés, CAPE : Ester phénéthylque de l'acide caféique, CAT : Catalase, Fe<sup>2+</sup> : Fer ferreux, GPx : Glutathion peroxydase, GSH : Glutathion réduit, GR : Glutathionéductase, GSSG : Glutathion oxydé, H<sub>2</sub>O : Eau, NADP<sup>+</sup> : Phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide oxydé, NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit, O<sub>2</sub> : Oxygène moléculaire, O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Radical anion superoxyde, OH<sup>-</sup> : Ion hydroxyle, OH· : Radical hydroxyle, ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite, NO : Oxyde nitrique, NOS : Oxyde nitrique synthase, AGPI : Polyinsaturé acide gras, SOD : Superoxyde dismutase

Les études de Caglayan et al., (2018) ont démontré que l'apoptose, l'autophagie, l'inflammation, le stress oxydatif et les dommages oxydatifs de l'ADN sont étroitement associés à la toxicité hépatique et rénale induite par le CPM et que les antioxydants naturels comme la naringénine a des effets protecteurs contre cette toxicité induite par le CPM. Les effets

protecteurs de la naringénine sont probablement dus à l'atténuation de l'apoptose, de l'autophagie, de l'inflammation, du stress oxydatif et des dommages oxydatifs de l'ADN (Figure 9).



**Figure 9:** Voie proposée illustrant le mécanisme de la naringine (NG) dans la prévention de l'apoptose, de l'autophagie, de l'inflammation, du stress oxydatif et des dommages oxydatifs de l'ADN induits par le cyclophosphamide (CPM) (Caglayan et al., 2018).

### 5.5. Reprotoxicité

Le traitement par le cyclophosphamide peut altérer l'oogenèse et la spermatogénèse, à l'origine d'une potentielle stérilité chez les deux sexes. Cette stérilité semble être dose-dépendante et elle peut être réversible à la fin du traitement, dans certains cas. (Baxter, 2013). En effet, une assez grande proportion des femmes traitées par CPM observe une période d'aménorrhée relative à une baisse des concentrations d'œstrogène et une augmentation de la

sécrétion de gonadotrophines. Ces symptômes disparaissent généralement quelques mois après l'arrêt de la thérapie. Les filles traitées pendant leur période prépubère grandissent en ayant, dans la plupart des cas, des caractères sexuels secondaires et des cycles menstruels normaux. La faculté de reproduction n'est alors pas altérée. Quelques cas de fibrose ovarienne ont cependant été rapportés lors de traitements prolongés chez des patientes en fin de période prépubère. **(Baxter, 2013)**. Chez les hommes traités par CPM, on observe aussi une augmentation de la production de gonadotrophines mais les concentrations de testostérone restent stables. Les patients sont alors sujets à développer une oligospermie (concentration de spermatozoïdes inférieure aux valeurs normales) pouvant s'accroître, et ceci jusqu'à 52 l'azoospermie (absence totale de spermatozoïdes). Ces troubles de la production de spermatozoïdes sont dans quelques cas réversibles, quelques années après l'arrêt du traitement (au lieu de quelques mois chez la femme). Quand la production de spermatozoïdes est réactivée, la possibilité d'avoir un enfant en bonne santé n'est alors pas altérée. Chez le garçon en période prépubère traité par cyclophosphamide, les caractères sexuels secondaires se développent normalement, cependant un degré variable d'atrophie testiculaire peut être rencontrée chez certains patients **(Baxter, 2013)**.

Le système reproducteur est très sensible à ce médicament en raison de la présence de cellules à division rapide. Les sujets masculins traités par le CPM présentent une oligospermie et une azoospermie ainsi que des altérations de la biochimie et de l'histologie des testicules et de l'épididyme. Les patients de sexe masculin traités par le CPM ont démontré une sécrétion perturbée des gonadotrophines et de faibles taux sanguins de testostérone associés à des lésions testiculaires **(Ghobadi et al., 2017)**. Les mécanismes exacts impliqués dans la toxicité du CPM dans les testicules sont mal compris ; cependant, de nombreuses études ont montré des perturbations biochimiques et génomiques suite à son exposition. Le métabolite du CPM, l'acroléine, augmente la peroxydation lipidique. De plus, il induit des dommages oxydatifs et des anomalies cytosquelettiques et réduit la viabilité des cellules de Sertoli. Étant donné que les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont abondants dans les spermatozoïdes et que la teneur en antioxydants de ces cellules est faible, la peroxydation des lipides est plus susceptible de se produire suite à un stress oxydatif. Diverses stratégies ont été proposées pour maintenir la fertilité suite à des dommages induits par le CPM. De nombreuses études ont montré que les antioxydants synthétiques et naturels peuvent être efficaces pour protéger les spermatozoïdes de la toxicité induite par le CPM **(Ghobadi et al., 2017)**.

## 5.6. Toxicité pulmonaire

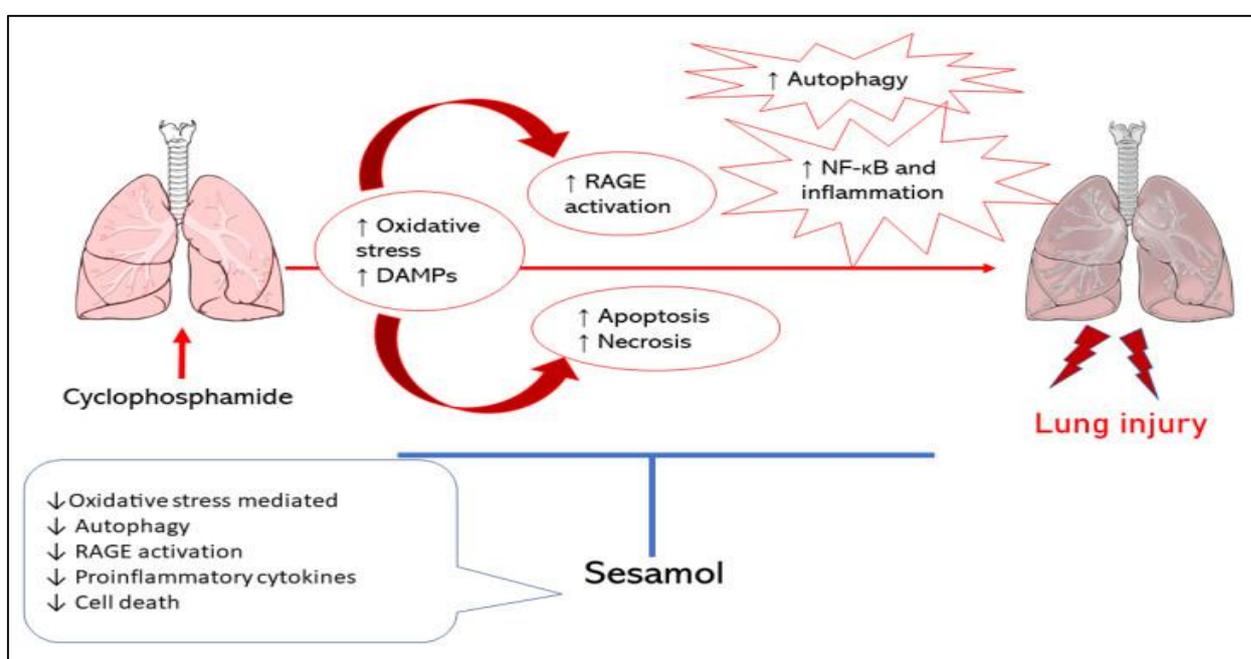
Des cas de pneumopathie (et de fibroses pulmonaires) ont été rapportés chez certains patients, après un traitement par CPM. Si ce type d'effets indésirables est rarement décrit, le pronostic des patients touchés est souvent mauvais. La pneumopathie peut apparaître plusieurs mois à plusieurs années après le début du traitement. Certaines de ces manifestations ont été décrites dès la première injection de CPM (ANSM, 2019).

Parmi les toxicités plus rares mais plus graves que le CPM peut engendrer au niveau des poumons, on compte la bronchiolite oblitérante avec une organisation pneumonique (BOOP) ou encore des hémorragies pulmonaires. La BOOP est caractérisée par la prolifération de fibroblastes immatures qui vont aller s'accumuler dans les bronchioles et former un bouchon étanche empêchant la circulation normale de l'air. La dyspnée est là aussi progressive et accompagnée d'une toux sèche et de fièvre (Rossi et al., 2000).

La toxicité pulmonaire provoquée par le cyclophosphamide, est de plus en plus fréquemment reconnue. Le métabolisme du cyclophosphamide dans les poumons en métabolites alkylants et en acroléine, un aldéhyde réactif, est en partie responsable de la toxicité pulmonaire. Des altérations de l'activité de l'oxydase pulmonaire à fonction mixte, de la teneur en glutathion et de la peroxydation lipidique microsomale peuvent être causées par le métabolite réactif acroléine. La protention des lésions pulmonaires induites par le cyclophosphamide dans des conditions hyperoxiques est causée par la dépression des mécanismes de défense antioxydants pulmonaires par le cyclophosphamide et ses autres métabolites, mais pas par l'acroléine. Les altérations de l'état physique de la bicouche lipidique membranaire induites par le cyclophosphamide et l'acroléine peuvent être la principale cause de l'inactivation des enzymes liées à la membrane. Ces données suggèrent que le cyclophosphamide et ses métabolites réactifs déclenchent des lésions peroxydatives entraînant des altérations de l'état physique des lipides membranaires qui peuvent être fonctionnellement liées aux manifestations de toxicité pulmonaire induite par le cyclophosphamide (Patel, 1990).

Cependant, il a été rapporté que le CPM provoque des lésions pulmonaires aiguës et chroniques chez les humains et les animaux. Bien que les mécanismes à l'origine des lésions pulmonaires causées par le CPM soient mal compris, il est possible que ces agents aient des effets toxiques directs ou soient indirectement toxiques par l'activation des cellules inflammatoires pulmonaires. La chimiothérapie CPM est souvent limitée par des lésions pulmonaires et/ou vésicales chez les animaux et les humains. Les premiers résultats

histopathologiques chez le rat ont démontré des lésions capillaires endothéliales, des lésions et des nécroses des pneumocytes de type II, un œdème pulmonaire et une infiltration de cellules inflammatoires. La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la formation de peroxydes lipidiques dans les microsomes pulmonaires interviennent dans les lésions pulmonaires dans ce modèle. Il a été rapporté que la perturbation de l'équilibre redox par le stress oxydatif (Figure 10) suite à une exposition au CPM provoque des changements biochimiques et physiologiques (El-Kashef & Rahim, 2023). Le manque d'enzymes détoxifiantes, d'aldéhyde oxydase et d'aldéhyde déshydrogénase dans les poumons est une cause de toxicité pulmonaire sélective induite par la CPM (Shokrzadeh et al., 2014).



**Figure 10** : L'effet cytotoxique du cyclophosphamide sur les poumons (El-Emam, 2021).

## 6. Cyclophosphamide et stress oxydatif

Le mécanisme d'induction de la toxicité par le cyclophosphamide est dû à un stress oxydatif et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) toxiques (Manda & Bhatia, 2003 ; Motawi et al., 2010). Il a été rapporté que les dommages oxydatifs de l'ADN sont causés par un dérivé hydroperoxyde du cyclophosphamide par la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Murata et al., 2004).

Le cyclophosphamide (CPM) est principalement métabolisé par le système enzymatique du cytochrome P450 dans le foie après administration systémique, se divisant en deux composés de base : la moutarde phosphoramidate et l'acroléine. La moutarde phosphoramidate agit comme un agent alkylant de l'ADN, indépendamment du cycle cellulaire, conférant ainsi son activité

antinéoplasique. D'autre part, l'acroléine est responsable des effets cytotoxiques en favorisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'organisme. De plus, elle perturbe les antioxydants tissulaires et les enzymes antioxydantes, entraînant une brèche dans le système de défense antioxydant normal et une accumulation continue d'ERO (**Basua et al., 2015**).

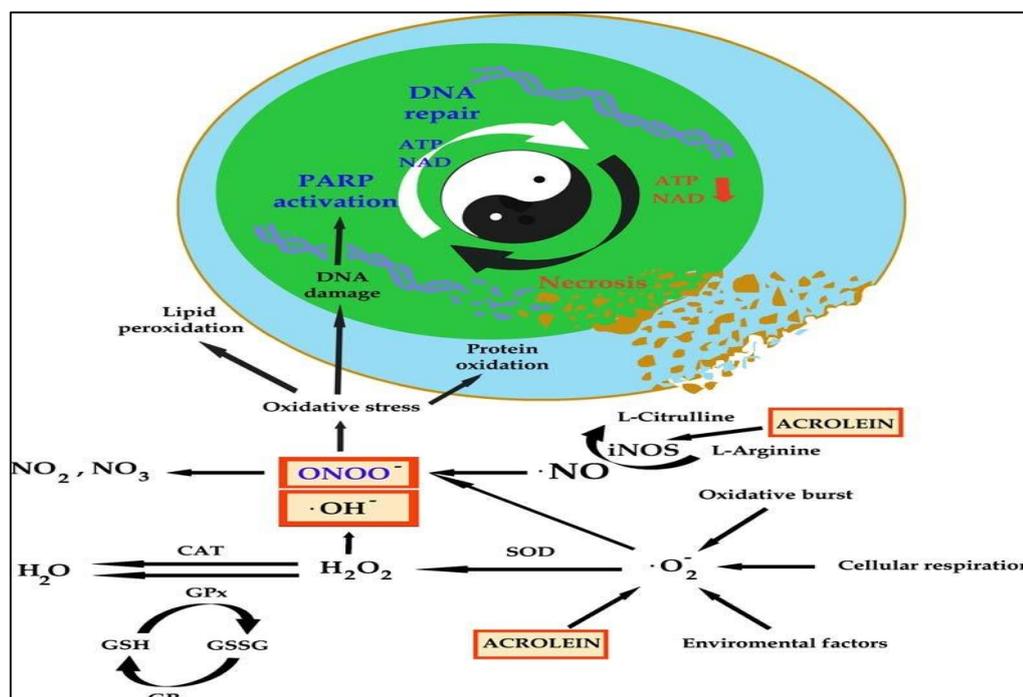
Dans le cycle cellulaire normal, les ERO sont produites endogènement lors de différentes activités cellulaires telles que la respiration mitochondriale, l'activité de la NADPH oxydase et l'oxydation des peroxysomes. Par ailleurs, des ERO peuvent également être générées de façon exogène par des facteurs externes tels que le rayonnement ionisant ou ultraviolet, ainsi que certains agents chimiothérapeutiques et stimuli environnementaux. À faible concentration, ces radicaux sont neutralisés par des mécanismes antioxydants naturels, comprenant notamment le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). Cependant, des niveaux élevés d'ERO perturbent l'homéostasie cellulaire, entraînant un arrêt du cycle cellulaire, des dysfonctionnements cellulaires et des dommages à l'ADN. Cette perturbation est particulièrement mise en avant comme étant la cause de la cytotoxicité induite par la chimiothérapie au cyclophosphamide (**Yilmaz E et al., 2018**).

Les défenses antioxydantes cellulaires, notamment les enzymes comme la SOD et la CAT, sont essentielles pour neutraliser les radicaux libres et atténuer le stress oxydatif. La SOD catalyse la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène ( $O_2$ ). La toxicité induite par le cyclophosphamide est associée à un stress oxydatif accru résultant de la diminution de l'activité de ces enzymes antioxydantes (Figure 11) (**Bhattacharjee, 2014**).

La toxicité de la CPM peut être décrite en trois étapes (Figure 11) :

- 1-La première est la pénétration rapide de l'acroléine dans les cellules épithéliales.
- 2- La molécule va ensuite créer des ERO intracellulaires et entrainer la production de monoxyde d'azote (NO), soit par son action directe, soit par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire-kappa B (NF- $\kappa$ B) ou l'activateur de protéine-1 (AP-1) qui vont aussi engendrer la production d'ERO, de NO et de cytokines.
- 3-Ces ERO vont ensuite s'associer au NO pour provoquer les impacts cités précédemment tels que la modification de certaines molécules de l'organisme, sur lesquels ils vont pouvoir se fixer par des liaisons covalentes. Ces molécules peuvent aussi occasionner des ruptures simples brin sur l'ADN qui entraînent automatiquement une activation de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). Cette enzyme en charge de la réparation de l'ADN consomme beaucoup d'énergie. En

étant suractivée par les nombreux dommages entraîne une diminution prononcée des concentrations d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et de  $\text{NAD}^+$  amenant à une nécrose de la cellule concernée (Korkmaz et al., 2007).



**Figure 11** : Les oxydants et les mécanismes de défense antioxydants impliqués dans la toxicité du cyclophosphamide. Une fois que l'acroléine est entrée dans les cellules, la production de ROS et l'activation d'iNOS augmentent. Un excès de NO entraînant la formation de peroxynitrite. Une fois produit, le peroxynitrite peut provoquer une peroxydation lipidique, une oxydation des protéines et des dommages à l'ADN (Korkmaz et al., 2007).

Les molécules de NO sont produites physiologiquement dans de nombreuses cellules par les nitric oxide synthases (NOS). Ces enzymes peuvent aussi être activées par des cytokines, des protéines de l'inflammation, ou par certains agents chimiques, comme ici l'acroléine. Dans l'épithélium comme dans le muscle lisse, le NO ainsi produit va ensuite pouvoir s'associer à un ion superoxyde  $\text{O}_2^-$ . Celui-ci est normalement pris en charge par une superoxyde dismutase (SOD), mais ici le NO est présent en trop grande quantité et entre en compétition avec la SOD. Cette association forme l'ion peroxynitrite  $\text{ONOO}^-$ . Ce n'est pas un radical en lui-même, mais un ion qui a un fort pouvoir oxydant le rendant donc précurseur de radicaux libres. C'est à cet ion que l'on attribue les dommages engendrés sur les lipides et les protéines, mais aussi sur l'ADN entraînant la suractivation de la PARP (Korkmaz et al., 2007).

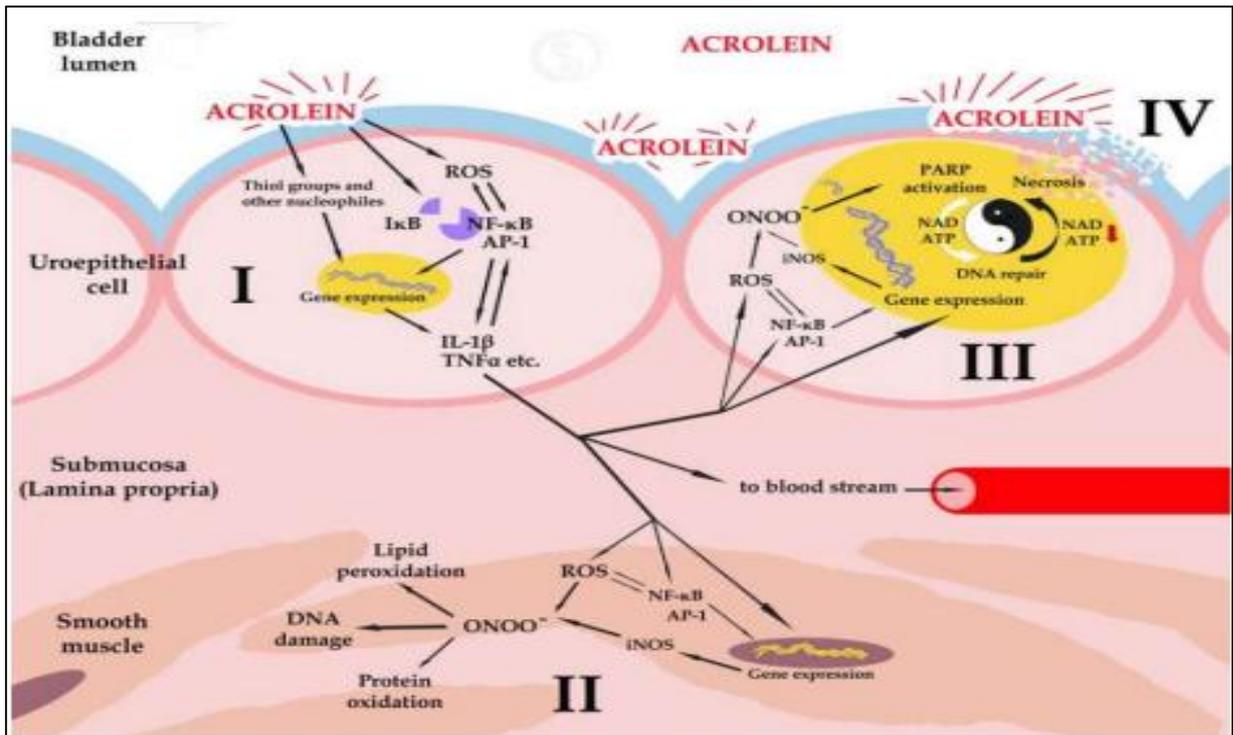


Figure 12 : Toxicité de l'acroléine (Korkmaz et al., 2007).

(I) Pénétration rapide de l'acroléine dans l'épithélium , qui agit sur l'expression des gènes, entraînant la dégradation de I- κB, et la production des ERO activant les cytokines pro-inflammatoires qui moduleront également l'expression de certains gènes (II) et (III) la dispersion des radicaux et des cytokines dans l'épithélium et le système sanguin et la formation de peroxyde nitrite à partir des NO et des ERO qui entraîne la peroxydation des lipides, les dommages sur l'ADN et l'oxydation des certaines protéines, trois paramètres induisant des dégâts irréversibles sur la cellule (IV), Mort par apoptose ou nécrose des cellules et la dispersion de leur contenu dans le tissu.

**Chapitre II :**  
**Le genre *Centaurium***

## 1. Historique

Le mot *Centaurium* vient du *grecken taureion* qui désignait dans la mythologie grecque un être hybride entre l'homme et le cheval. Les centaures étaient considérés comme férus en médecine. Selon Pline, le centaure Chiron aurait soigné avec cette plante son pied blessé par une flèche. La langue populaire transforma l'étymologie du mot en *centum aurei* (= cent pièces d'or). Cela donna en allemand «Hundertguldenkraut», encore utilisé au 16ème siècle. Il en résulta ensuite «Tausendguldenkraut» (= mille pièces d'or) qui exprime encore mieux la haute estime dont jouissait la plante. A cause de son goût amer, les Romains l'appelaient *Herba felis terrae* qui signifie «herbe de la bile de terre». Minus, le nom de l'espèce, dérive du latin minor pour «petit» ou «mineur». On retrouve des traces de l'usage médicinal de la petite centaurée jusque chez les disciples d'Hippocrate (5ème et 4ème siècle av. J.-C.). Dioscoride la recommandait comme purgatif et emménagogue, ainsi que pour soigner les yeux et panser les plaies (<https://www.avogel.ca/fr/encyclopedie-plantes/centaurium.php>).

## 2. Description botanique du genre *Centaurium* :

Le genre botanique *Centaurium* désignées les petites centaurées en nom vernaculaire est caractérisé par leur feuilles non épineuses alternes, les fleurs ou fleurons sont disposées en capitules, entourées d'un involucre de bractées, ses fleurs sont de cinq pétales qui sont souvent de couleur rose pourpre et violet : *Centaurium erythraea Rafn* mais il existe d'autres espèces à fleurs jaunes : *Centaurium maritimum* (Momcilov et al.,2016).

La petite centaurée est une petite plante herbacée, annuelle ou bisannuelle, glabre, de 10 à 30 cm de hauteur, rarement plus. Elle pousse spontanément sur des sols siliceux, argileux ou marneux, dans les prés, pâturages, clairières et lisières de bois jusqu'à une altitude de 1 400 mètres. Ses tiges divisées en rameaux dressés sont garnies de feuilles opposées décussées, larges, ovales et en rosettes pour les radicales (prenant naissance de la base de la tige), oblongues puis linéaires pour celles du haut, apparaissant de juin à septembre, sont en cymes corymbiformes plates et denses.

Les fruits sont des capsules bivalves contenant de nombreuses petites graines rougeâtres. Hétérosides sécoiridoïdiques expliquant l'amertume de la drogue : Swertiamarine (prédominante), swéroside, gentiopicroside, érythrocentauroside, centauroside, et sécoiridoïdes, la centapicrine et la désacétylcentapicrine. Acides-phénols dérivés des acides benzoïque, cinnamique ou phénylacétique, esters hydroxylés des acides téréphtaliques. Autre composé

phénolique : isocoumarine, Flavonoïdes (jusqu'à 0,5 %) : flavonols fortement glycosylés et souvent estérifiés, Xanthones polysubstituées (méthylbellidifoline, eustomine). Triterpènes (en faible quantité). Stérols. La petite centaurée est inscrite à la Pharmacopée européenne (**Lorrain, 2019**).

### 3. Taxonomie du genre *Centaurium*

*Centaurium*, également connu sous le nom de petites centaurées, est le plus grand genre de la famille des *Gentianaceae*, Toutes les espèces végétales du genre *Centaurium* appartiennent à la famille des *Gentianaceae*, à l'ordre des Gentianales et à la classe des *Magnoliopsida*.

**Tableau 1** : Données Taxonomiques de *Centaurium* sp (inpn.mnhn.fr).

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous règne</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Gentianales</i>
<b>Famille</b>	<i>Gentianaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Centaurium</i>

### 4. Distribution géographique

Le genre de *Centaurium* est cosmopolite, il comprend environ 50 espèces réparties dans l'hémisphère nord, notamment en Grande-Bretagne, en Scandinavie, dans le bassin méditerranéen, en Asie du Sud-Ouest et en Afrique du Nord. On considère que le genre *Centaurium* est originaire de la région méditerranéenne et de l'Amérique centrale. De nombreuses espèces se trouvent également en Amérique du Nord, en Californie et au Mexique. Les espèces végétales du genre *Centaurium* vivent généralement dans différents types d'habitats et de sols (calcaire, alumine, sable et marais (**Waymell et al., 2015 ; Momcilov et al., 2016**)).

En Europe ces espèces sont menacées non seulement par suite des effets de l'industrialisation mais aussi parce qu'elles sont très récoltées à des fins pharmaceutiques. La culture des plantes de

ce genre serait une bonne solution mais elle est difficile et onéreuse. Médicinalement on utilise les sommités, fleuries. La drogue est sans odeur et a une saveur amère prononcée (Waymell et al., 2015).

## 5. Les espèces du genre *Centaurium* les plus rencontrées en Algérie

### 5.1. *Centaurium erythraea* Rafn

*Centaurium erythraea* Rafn. (syn. *C. umbellatum* Gillib et *C. minus* Moench), connue sous le nom de centaurée commune, est une plante médicinale annuelle ou bisannuelle de 10-50 cm de hauteur avec un arbre quadrangulaire ramifié dans la partie supérieure. Les feuilles de la pousse sont opposées, oblongues-ovales à lancéolées-elliptiques, et principalement disposées en rosette. Les fleurs de couleur rose-rouge forment une inflorescence compacte. Dans son habitat naturel, la centaurée fleurit de juillet à septembre. *C. erythraea* est une espèce végétale cosmopolite qui habite les prairies sèches et les broussailles, les sols salins et les pentes montagneuses (Momcilov et al., 2016).

**Nom Scientifique:** *Centaurium erythraea* Rafn , 1800.

**Nom En Français:** Petite- Centauree, Herbe-la-fievre , Herbe-a-mille-florins, Gentianelle, Fiel-de-terre, Herbe-au Centaure, Herbe-a-Chiron.

**Nom En anglais:** Centaury, Feverwort, Earth-gall.

**Sous-Espece :** *Centaurium erythraea* Subsp. *Grandiflorum* (Biv.) Melder

#### **Synonyme(S) Du Nom Scientifique :**

- *Erythraea centaurium* Subsp. *grandiflora* (Biv.) Rouy.
- *Erythraea grandiflora* Biv.
- *Centaurium grandiflorum* (Biv.) Druce.



**Figure 13:** *Centaurium erythraea* (Tobyn et al., 2011)

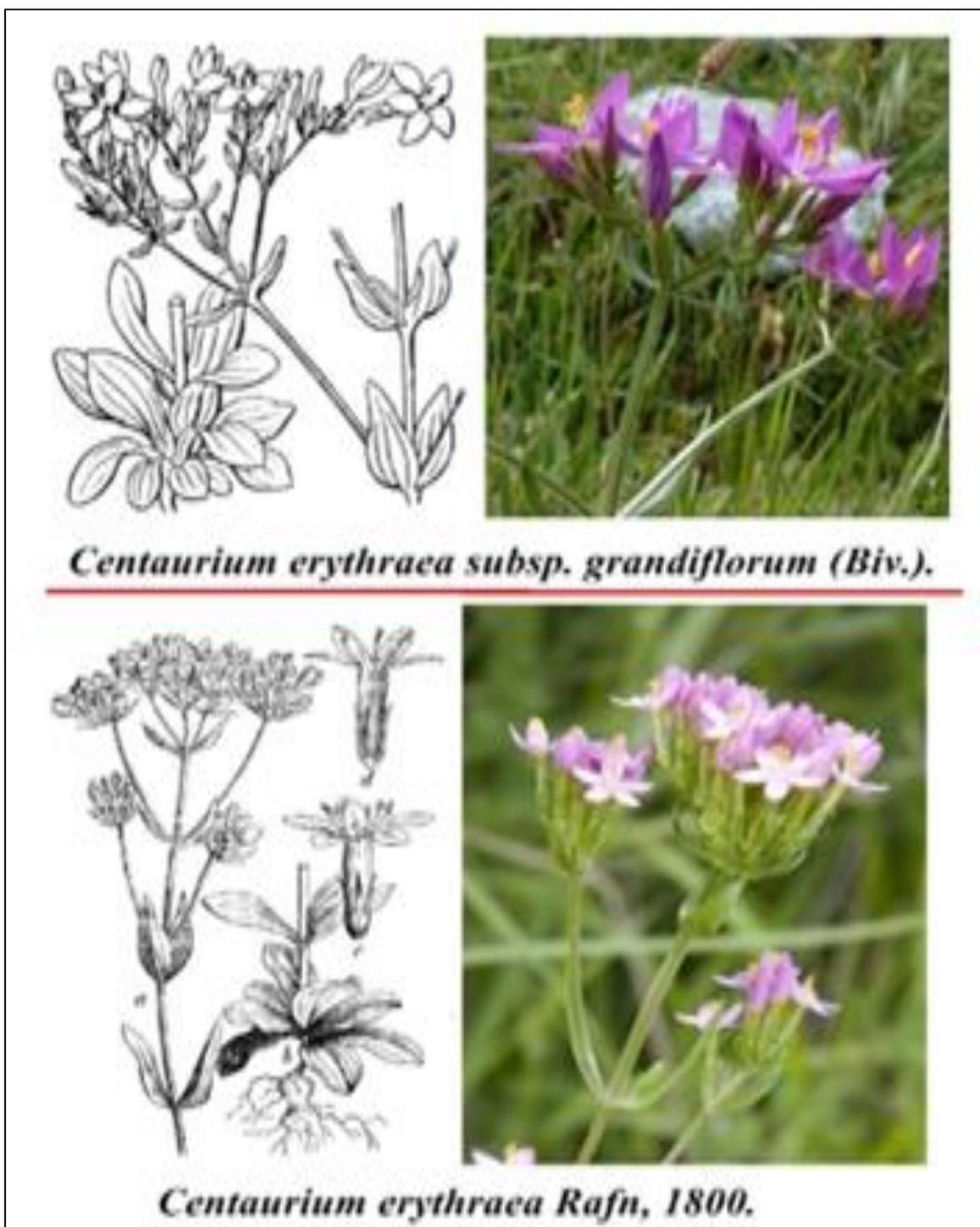


Figure 14 : Comparaison entre les 2 sous espèces *Centaurium erythraea* (Amiar, 2016)

### 5.2. *Centaurium pulchellum* (Sw.) Druce

*Centaurium pulchellum* (Sw.) Druce est une plante herbacée annuelle. Cette espèce est autofécondée et forme des inflorescences dichasiales. Elle est largement répandue en Europe, mais est plutôt rare en Serbie. On sait que la plupart des espèces du genre *Centaurium* sont des plantes médicinales. Cela s'applique également à *C. pulchellum*, qui est une riche source de secoiridoïdes et de xanthones. Heureusement, ces plantes sont faciles à entretenir in vitro, où elles peuvent être multipliées tout au long de leur cycle de vie naturel, y compris une croissance végétative rapide, une floraison, une fructification et une production de graines viables (Todorovic et al., 2009).

#### ✚ Synonyme(S) Du Nom Scientifique:

- *Erythraea pulchella* (Swartz) Fries
- *Erythraea ramosissima* (Vill.) Pers.
- *Gentiana pulchella* Swartz.
- *Centaurium anatolicum* (K.Koch).
- *Centaurium aaspicum* (Fisch.) Tzvelev.
- *Chironia erythraea* Schousb.
- *Chironia gerardii* F.W. Schmidt.
- *Chironia inaperta* Willd.
- *Chironia intermedia* Merat.
- *Chironia maritima* Georgi.
- *Chironia minor* Desf.



**Figure 15** : *Centaurium pulchellum* (Sw.) Druce (Amiar, 2016)

### 5.3. *Centaurium tenuiflorum*

Cette centaurée ressemble beaucoup à *C. pulchellum* avec laquelle elle a été confondue et en diffère principalement par son port. Elle est plus grande, bien dressée et ramifiée uniquement dans la partie haute (FLOREALPES.com).



**Figure 16 :** *Centaurium tenuiflorum* (Singhurst et al., 2015)

## **6. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Centaurium***

La petite centaurée est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies telles que le diabète, la fièvre, la rhinite, les maux d'estomac, les infections des voies urinaires, les troubles dyspeptiques, la perte d'appétit et les hémorroïdes, et comme diurétique. Les huiles essentielles et les extraits de *C. erythraea* présentaient de nombreuses propriétés biologiques telles qu'agent antibactérien, antioxydant, antifongique, antileishmanien, anticancéreux, antidiabétique, anti-inflammatoire, insecticide, diurétique, gastroprotecteur, hépatoprotecteur, dermatoprotecteur, neuroprotecteur et inhibiteur du développement larvaire. La caractérisation phytochimique de *C. erythraea* a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires tels que les xanthonoïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les acides gras (Šiler & Mišić, 2016).

## **7. La toxicité du genre *Centaurium***

Pour valider des bénéfices aussi importants pour la santé humaine, Tahraoui et al. (2010) ont mené une série d'analyses sur la toxicité aiguë et subchronique de *C. erythraea* chez

les rongeurs. À savoir, ils n'ont enregistré aucun décès ni aucun signe de toxicité après l'administration orale de doses uniques d'extrait lyophilisé de *C. erythraea* à n'importe quel niveau de dose jusqu'à la dose la plus élevée testée (15 g/kg de poids corporel). Cependant, le taux de mortalité ainsi que la toxicité aiguë de l'extrait de *C. erythraea* administré par voie intrapéritonéale ont augmenté progressivement avec l'augmentation de la dose : le taux de mortalité de 0 % jusqu'à une dose de 8 g/kg est progressivement passé à 80 % à 14 g/kg, la dose la plus élevée étudiée. La dose de toxicité aiguë (DL50) de l'extrait administré par voie intrapéritonéale chez la souris aurait été de 12,13 g/kg.

Les mêmes auteurs ont résumé l'effet des injections orales subchroniques:

Tous les autres paramètres hématologiques (RBC, WBC, plaquettes, HGB, HCT, MCH et MCHC) sont restés dans les limites normales tout au long de la période de traitement dans les groupes traités (dose de 600 mg/kg et 1 200 mg/kg) par rapport aux témoins.

L'administration orale répétée d'extrait de *C. erythraea* (jusqu'à une dose quotidienne de 1200 mg/kg de poids corporel pendant 90 jours) n'a pas provoqué de modifications significatives de la créatinine plasmatique, de l'urée, les protéines totaux, bilirubine totale, cholestérol et enzymes marqueurs hépatiques (ALAT et ASAT). Par conséquent, les auteurs déduisent raisonnablement que l'administration subchronique de l'extrait de *C. erythraea* n'a causé aucun dommage au foie ni aux reins. Ils confirment en outre cette affirmation par l'examen histopathologique d'organes sélectionnés (foie et rein) récupérés sur des animaux traités et témoins présentant une architecture normale. Ces observations suggèrent que il n'y a eu aucun effet néfaste ni perturbation morphologique provoqués par l'administration orale quotidienne de l'extrait de plante pendant 90 jours, même à des doses élevées comme 1200mg/kg (**Tahraoui et al., 2010**).

Compte tenu de la dose humaine de *C. erythraea*, en médecine traditionnelle, qui est d'environ une à deux tasses de préparation liquide contenant environ 2 à 4 g de matière végétale par litre d'eau et du fait que le médicament est jamais emprunté par voie intrapéritonéale, **Tahraoui et al. (2010)** suggèrent qu'il est prudent de conclure que l'utilisation traditionnelle de *C. erythraea* ne présente aucun risque de toxicité. Cependant, pour confirmer le caractère non toxique de tout produit végétal, **Tahraoui et al. (2010)** recommandent de prendre en compte plusieurs facteurs susceptibles de modifier le profil de toxicité de la plante, notamment le stade de croissance et la maturité de la plante, la ou les parties spécifiques de la plante utilisées (telles que les feuilles, les racines, les fleurs, les graines), la variation saisonnière de l'abondance

relative des composés phytochimiques, les conditions de stockage du produit (fraîchement collecté ou stocké longtemps), etc.

## 8. Description phytochimique de *Centaurium*

Dans le règne végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories. Tout d'abord, il y a les composés produits dans toutes les cellules, jouant un rôle central dans le métabolisme et la reproduction, tels que les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. Ces molécules sont connues sous le nom de métabolites primaires (Yang et al., 2011).

Ensuite, il existe des molécules qui peuvent être caractéristiques de certaines familles ou espèces végétales, mais qui ne sont pas indispensables à la survie de la plante. Ces molécules correspondent aux métabolites secondaires, classés en trois grands groupes : les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. Contrairement aux métabolites primaires, la plupart des métabolites secondaires sont synthétisés en réponse à un stress biotique et/ou abiotique. Ils ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes, ce qui suscite un intérêt majeur dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et agronomique. Ces métabolites secondaires jouent souvent un rôle dans la défense des plantes contre les herbivores, les pathogènes et les conditions environnementales adverses (Yang et al., 2011).

Les espèces végétales appartenant à la famille des gentianacées se caractérisent par la présence de métabolites secondaires aux propriétés médicinales. Les espèces de *Centaurium* produisent deux types de composés bioactifs, les terpénoïdes, les iridoïdes, les phénols, les xanthones, et les flavonoïdes (Momcilov et al., 2016).

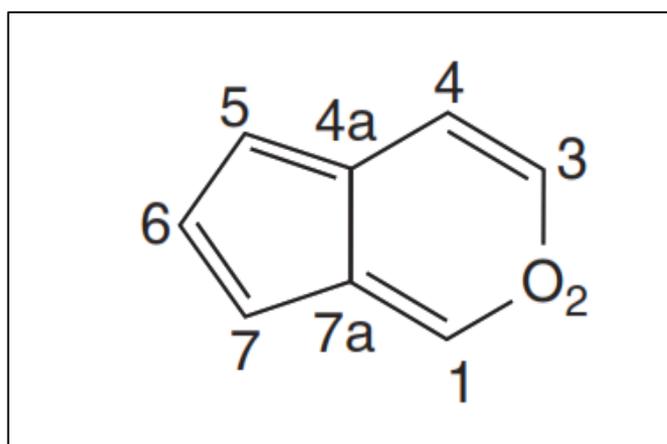
### 8.1. Iridoïdes

Les iridoïdes sont des composés naturels qui appartiennent à la classe des monoterpènes. Les iridoïdes sont largement répandus dans le monde végétal et peuvent être trouvés dans environ 60 familles de plantes, y compris la famille des Gentianaceae. À ce jour, plus de 1 200 iridoïdes et secoiridoïdes différents ont été identifiés. La structure de base des iridoïdes est l'anneau cyclopentane-(c)-pyranne (figure 17). D'après leur structure chimique, les iridoïdes appartiennent aux monoterpènes monocycliques. Les iridoïdes sont dérivés du géranium et peuvent être métabolisés en loganine. La voie de biosynthèse la plus importante, en particulier pour les espèces végétales des Gentianaceae, va dans le sens de la transformation de la loganine en sécologanine, qui peut ensuite être transformée en sweroside, swertiamarin et gentiopictine

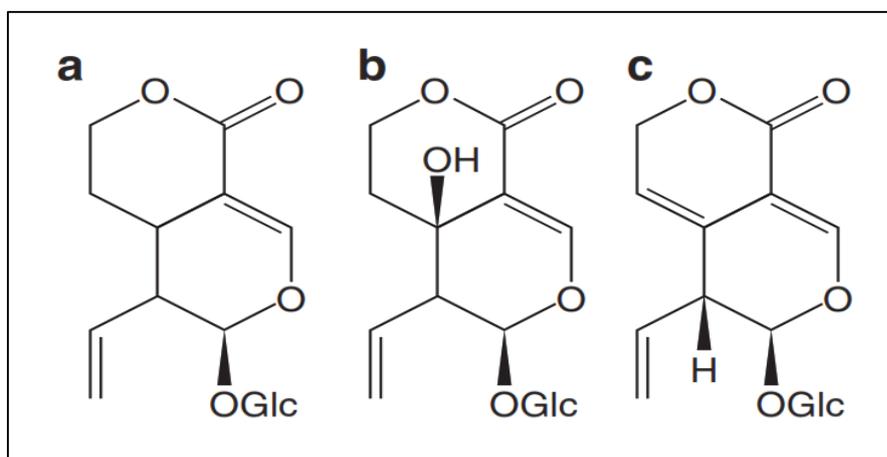
(figure 18), des secoiridoïdes que l'on trouve couramment chez les espèces de *Centaurium* (Momcilov et al., 2016).

Les composés iridoïdes appartiennent aux glucosides secoiridoïdes au goût amer. Ces composés bioactifs possèdent des activités hépatoprotectrices, cholérétiques, pancréatiques, antimicrobiennes, antimutagènes et antioxydantes. Ils sont souvent utilisés comme stimulateurs de la sécrétion des sucs gastriques et intestinaux et augmentent donc l'appétit et améliorent la digestion. Il a également été démontré que de nombreux glycosides iridoïdes peuvent servir de diurétiques (Momcilov et al., 2016).

Les alcaloïdes iridoïdes monoterpéniques, la gentianine, la gentianidine et la gentioflavine, étaient dérivés des glycosides iridoïdes (Handjieva et al 1991) et l'incubation anaérobie de la swertiamarine avec des bactéries intestinales a montré que trois métabolites principaux étaient produits, dont l'érythrocentaurine et la gentianine (El-Sedawy et al 1989).



**Figure 17** : La structure de base des iridoïdes (cycle cyclopentane-(c)-pyrann (Momcilov, 2016)



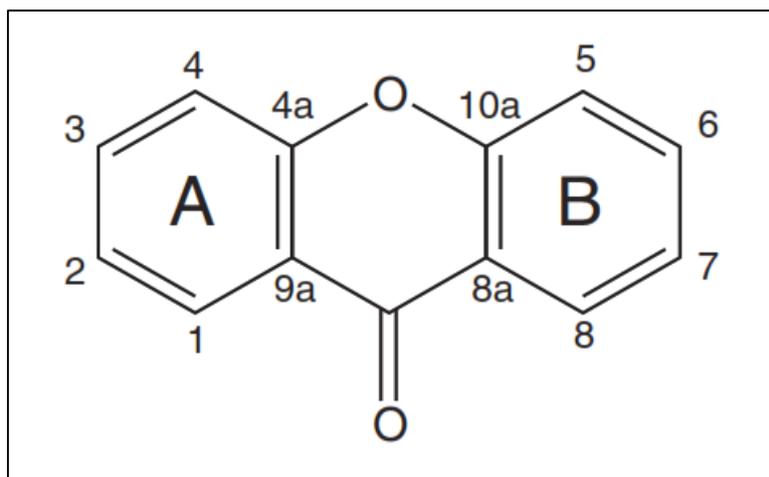
**Figure 18**: Sécoiridoïdes caractéristiques des espèces de *Centaurium*. (a) Sweroside, (b) swertiamarin, et (c) gentiopicrin (Momcilov,2016).

## 8.2. Xanthone

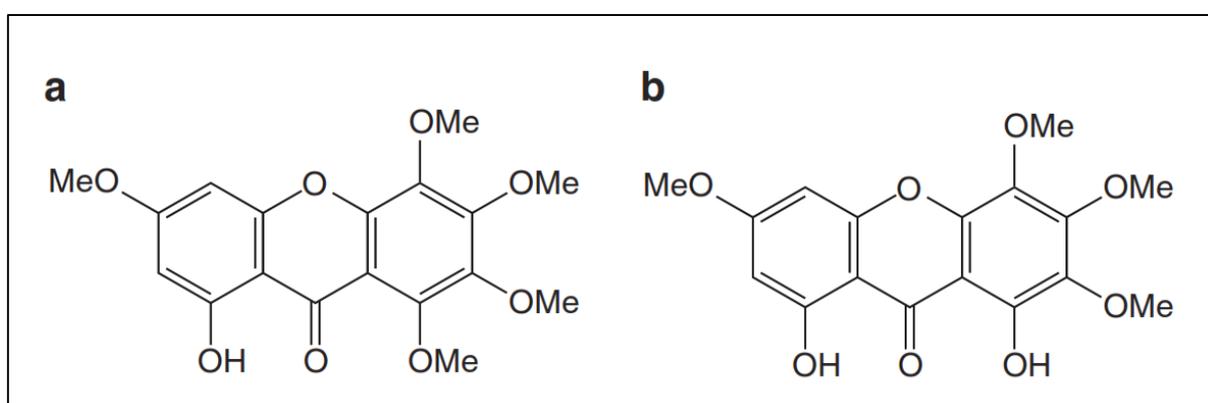
Les xanthonnes sont des composés naturels appartenant à la classe des polyphénols végétaux. D'après leur structure chimique, les xanthonnes et les flavonoïdes sont très similaires. Les deux groupes de ces composés naturels partagent la structure benzo- $\gamma$ -pyrone (figure 19). Contrairement aux flavonoïdes largement répandus, les xanthonnes ne sont déterminées que dans quelques familles. Le plus grand nombre de xanthonnes est identifié dans les familles Gentianaceae (plus de 110 xanthonnes) et Clusiaceae. Les espèces de *Centaurium* comprennent des xanthonnes tétra-, penta- et hexaoxygénées présentes sous forme libre (aglycones) ou sous forme de O-glucosides. Toutes les xanthonnes substituées proviennent de 1,3,5 ou 1,3,7-trihydroxyxanthonnes (**Momcilov et al., 2016**).

Chez les centaurées, l'acide 3-hydroxybenzoïque est utilisé comme composé initial pour la biosynthèse de la tétrahydroxyxanthone. La biosynthèse de la xanthone est obtenue par conversion de l'acide 3-hydroxybenzoïque en 3-hydroxybenzoyl-CoA et en tétrahydroxybenzophénone, convertie à son tour en trihydroxyxanthone. Deux xanthonnes méthoxylées, la 1-hydroxy-3,5,6,7,8-pentaméthoxyxanthone connue sous le nom d'eustomine (figure 20) et la 1,8-dihydroxy-3,5,6,7-tétraméthoxyxanthone connue sous le nom de déméthyléustomine (figure 20), sont les composés xanthoniques caractéristiques des espèces *C. erythraea* et *C. pulchellum* (**Momcilov et al., 2016**).

À ce jour, plus de 100 composés xanthone différents ont été isolés à partir de 110 espèces végétales. Ces dernières années, les xanthonnes sont devenues plus intéressantes car elles présentent différents effets pharmacologiques tels que cardioprotecteurs, antipaludiques, antimicrobiens, antioxydants, antimutagènes et anticancéreux. On sait que les xanthonnes agissent comme des antidépresseurs. Des études antérieures ont également montré que les xanthonnes pouvaient inhiber le VIH. Aujourd'hui, les effets des xanthonnes naturelles et synthétiques sur le système nerveux central et la croissance des cellules tumorales sont étudiés. Outre leurs valeurs pharmacologiques, les xanthonnes sont des marqueurs systématiques très utiles en hémotaxonomie (**Momcilov et al., 2016**).



**Figure 19** : Structure de base des xanthones (Momcilov, 2016).



**Figure 20** : Xanthones caractéristiques des espèces de *Centaurium*. (a) Eustomin et (b) demethyleustomin (Momcilov, 2016)

Les techniques de culture *in vitro* ont permis d'augmenter la production de métabolites secondaires précieux, En outre le profil des métabolites secondaires du *Centaurium erythraea* transgénique, une espèce de ce genre, a été étudié pour son potentiel en tant que producteur de composés anticancéreux. Ces résultats soulignent l'importance des espèces de *Centaurium*, non seulement dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans le développement potentiel de nouveaux agents pharmacologiques (Momcilov et al., 2016).

### 8.3. Acides phénoliques

Les acides phénoliques n'ont que rarement été étudiés pour les espèces de *Centaurium*, et au total neuf composés, sept d'entre eux appartenant au groupe des acides hydroxycinnamiques et deux aux acides hydroxybenzoïques ont été identifiés chez *C. erythraea*. Les acides férulique et sinapique, l'acide caféique et l'acide rosmarinique (un ester de l'acide caféique) ont été rapportés pour *C. erythraea*, mais aussi l'acide p-coumarique et ses dérivés ombelliférone et 5-formyl 2,3-dihydroisocoumarine. Les acides benzoïques sont des précurseurs de la biosynthèse

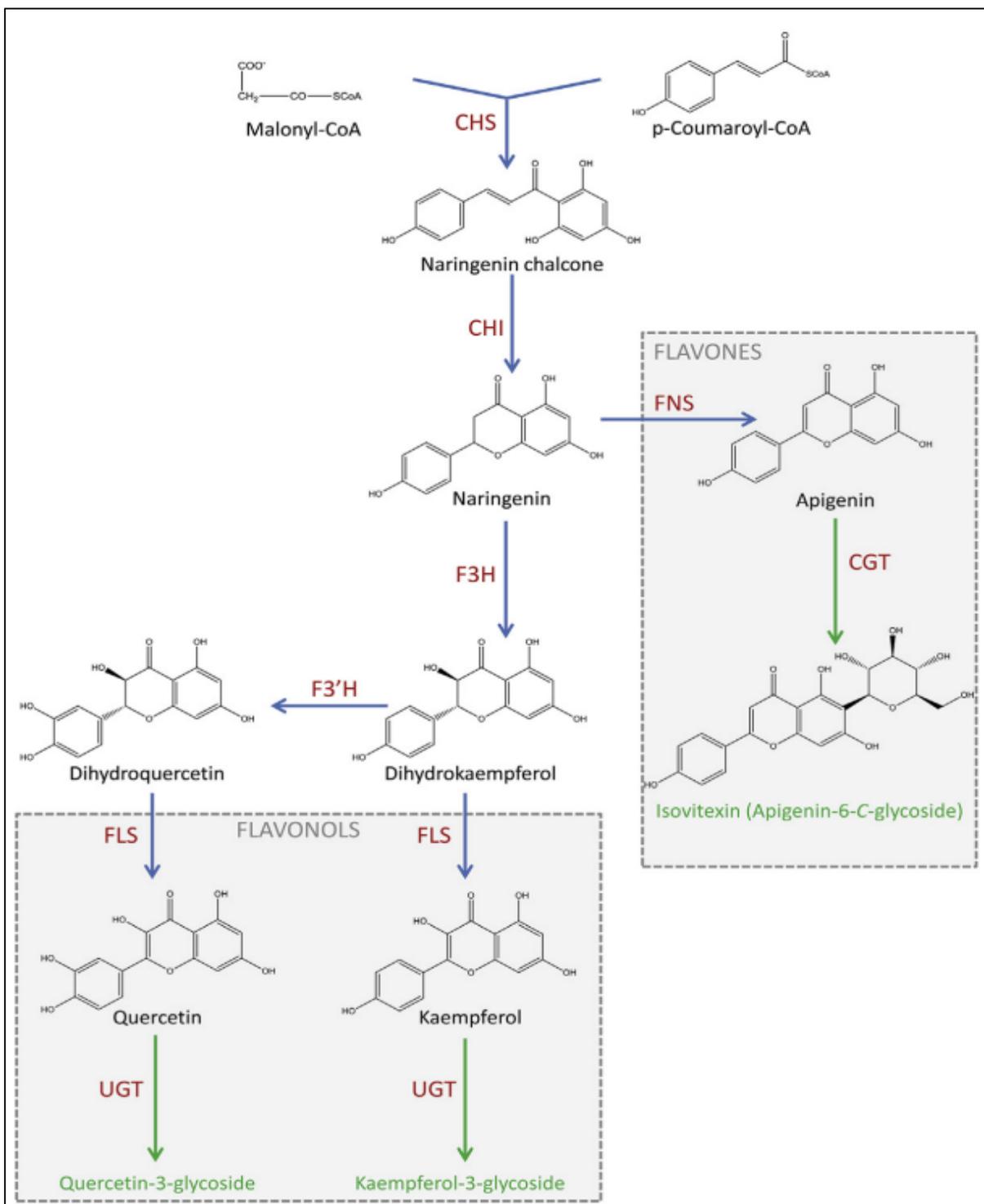
des xanthones. Fait intéressant, l'acide 3-hydroxybenzoïque (syn. m-hydroxybenzoïque acide) est le substrat de départ dans les cultures cellulaires de *C. erythraea*, comme le montrent les expériences d'alimentation avec de la L-phénylalanine radiomarquée, de l'acide benzoïque et de l'acide 3-hydroxybenzoïque. L'absence d'incorporation de radiomarqueurs dans l'acide cinnamique indique que l'acide 3-hydroxybenzoïque dans les cultures cellulaires de *C. erythraea* passe par une voie indépendante du PAL et que cet acide phénolique semble provenir directement de la voie du shikimate (Šiler & Mišić, 2016).

#### 8.4. Les Flavonoïdes

Deux sous-classes de flavonoïdes ont été détectées chez les espèces de *Centaurium* : les flavones et les flavonols.

Les flavones des espèces *Centaurium* sont représentées par la lutéoline, l'apigénine et les glycosides d'apigénine, tous identifiés chez *C. erythraea*. L'apigénine-6-Cglucoside (isovitexine) trouvée dans *C. erythraea* est l'une des C-glucoflavones les plus courantes parmi les *Gentianaceae* (Šiler & Mišić, 2016).

Les flavonols constituent de loin le groupe de flavonoïdes le plus abondant chez les espèces *Centaurium*, représenté par la quercétine, le kaempférol et leurs dérivés (glycosides et glycosides acétylés). La dernière étape de la formation des flavonol aglycones est médiée par les flavonol synthases. Les aglycones de flavonol sont généralement glycosylés par des glycosyltransférases UDP – dépendantes des glucides (UGT), qui transfèrent les sucres vers leurs substrats aglycones par la formation d'une liaison glycosidique. Les glycosides de flavonol identifiés jusqu'à présent chez les espèces *Centaurium* sont exclusivement glycosylés en position 3-OH (Šiler & Mišić, 2016). Il est intéressant de noter que les glycosides de flavonol acétylés ne sont actuellement signalés que pour *Centaurium spicatum* (syn. *Schenkia spicata*), qui est taxonomiquement distinct des autres espèces de *Centaurium*.



**Figure 21:** La voie de biosynthèse possible des principaux flavonoïdes présents chez les espèces *Centaurium*. Les enzymes sont abrégées comme suit : CGT, C-glycosyltransférase ; CHI, chalcone isomère ase, CHS, chalcone synthase ; F3H, flavanone 3-hydroxylase ; F3'H, flavonoïdes 3'-hydrpxylase ; FLS, flavone synthase ; UGT, UDP-glycosyltransférase dépendante du sucre (Siler et Mistic, 2016)

## 8.5. Terpénoïdes

Les espèces de *Centaurium* ne sont pas reconnues comme plantes aromatiques, ce qui explique probablement le peu d'études phytochimiques sur la composition de leurs composés organiques volatils. Les analyses GC–MS et headspace (HS-SPME) des huiles essentielles de *C. erythraea* ont révélé la présence de terpénoïdes appartenant aux monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, diterpénoïdes et triterpénoïde (Šiler & Mišić, 2016).

### 8.5.1. Monoterpénoïdes

Les hydrocarbures monoterpénoïdes sont courants dans *C. erythraea*, notamment l' $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène, le p-cymène, l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -terpinène, le terpinolène, le sabinène, le myrcène et le limonène. Parmi les monoterpénoïdes oxygénés, terpinène-4-ol, menthone, linalol,  $\beta$ -thuyone, camphre, isomenthone, menthol, acétate de menthyle, 1,8-cinéole, bornéol, acétate de bornyle, p-cymen-8-ol,  $\alpha$ -terpinéol, le trans-anéthole, la pulégone, le nérol, la carvone, le géraniol et la verbénone sont identifiés chez *C. erythraea*.

Le géraniol, un alcool monoterpénoïde présent dans l'huile essentielle de la même espèce végétale, serait le précurseur de la voie de biosynthèse des glycosides sécoiridoïdes. Les monoterpènes phénols thymol, méthylthymol et carvacrol sont également présents dans l'huile essentielle de *C. erythraea* (Šiler & Mišić, 2016).

## 8.6. Stérols

Bêta-sitostérol, stigmastérol, campestérol, brassicastérol, delta 7 stigmastérol (parties aériennes) (Tobyn et al., 2011).

## 8.7. Coumarines

Isocoumarine (sauvage, Portugal) (Tobyn et al., 2011).

# **Partie II :**

# **Etude expérimentale**

## I. Matériel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

La plante *Centaureum* sp a été récoltée en juin 2019 de la région de Jijel. Les parties aériennes (les fleurs et les feuilles) de la plante sont nettoyées, puis séchées dans un endroit sec et aéré et à l'abri de la lumière. Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique, la poudre obtenue est prête à la préparation de l'extrait hydro méthanolique.

### 1.2. Préparation de l'extrait hydro- méthanolique

Une quantité de 50 grammes du matériel végétale broyé a été macérée dans 400 ml d'un solvant hydro-méthanolique (MeOH/H<sub>2</sub>O, 80/20, v/v), le mélange a été bien agité et laissé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 72 h. Ce processus est répété 3 fois avec un renouvellement du solvant chaque 24 h. Ce mélange est filtré sur papier filtre Whatman, le filtrat obtenu est évaporé et concentré sous basse pression à 35 - 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, afin d'obtenir un extrait hydro méthanolique brut. Ce dernier est finalement pesé et conservé à 4°C dans un flacon stérile.

### 1.3. Dosage des métabolites secondaires

#### 1.3.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TCP)

Le dosage des composés phénoliques totaux dans l'extrait a été effectué par le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**). Ce dernier est un acide jaune, formé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont réduits pendant l'oxydation des phénols pour donner un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La teneur totale en phénols dans l'extrait de la plante a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode décrite par **Singleton et al. 1999**. L'extrait 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 :

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

### 1.3.2. Dosage des flavonoïdes

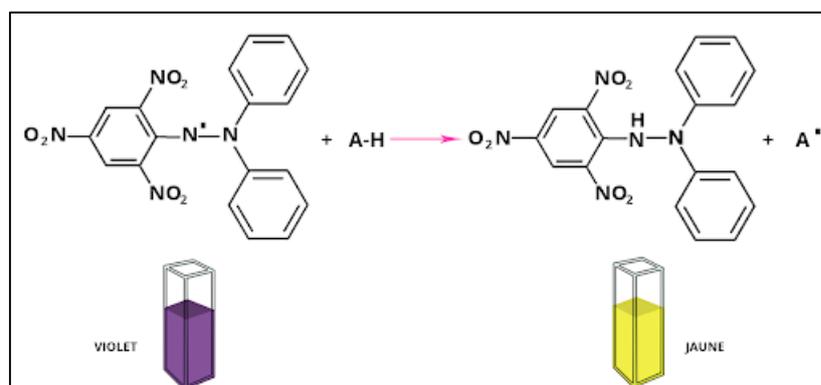
La teneur total en flavonoïdes a été estimé selon la méthode décrite par Wang et al. 2008. A chaque 0,5 ml de l'extrait préparé dans le méthanol, 0,5 ml d' $\text{AlCl}_3$  à 2% a été ajouté. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. La concentration totale des flavonoïdes a été calculée en  $\mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine (QE) pour 1 mg de l'extrait à l'aide de l'équation suivante :

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

## 1.4. Activité antioxydante *in vitro*

### 1.4.1. Activité de piégeage du radical DPPH $\cdot$

Le test DPPH mesure l'activité de donneur d'un atome d'hydrogène (ou électron) et fournit donc une évaluation de l'activité antioxydante due à la réduction des radicaux libres. Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), un radical libre stable de couleur violette, est réduit en diphénylpicrylhydrazine non-radicalaire de couleur jaune (Figure 3).



**Figure 22** : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Maataoui et al., 2006).

La capacité de l'extrait de la plante 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'absorbances 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.

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 des standards.

## 2. Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait

Nous avons utilisé des souris femelles adultes de souche *Swiss albinos* pesant entre 25 et 30g. Les animaux ont été fournis et hébergés à l'Animalerie de faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Constantine 1, Algérie dans des conditions expérimentales standard, Les souris sont soumises pendant 7 jours à une période d'adaptation avant chaque expérimentation, où elles ont un accès libre à l'eau et à l'aliment. L'expérimentation animale a été réalisée en stricte conformité avec les normes éthiques des lignes directrices internationales pour l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des plantes médicinales (Organisation de coopération et de développement économiques) (OCDE 2008).

Les animaux ont été mis à jeun avec accès libre à l'eau pendant 3 h avant l'administration des doses. Ils sont pesés et marqués juste avant l'administration de l'extrait. La sélection de la dose a été effectuée sur la base d'une étude de toxicité orale aiguë (250, 500, 1000, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel) conformément aux lignes directrices 425 de l'OCDE.

Les animaux ont repartis en 06 lots. Chaque lot contenait 05 animaux: un lot témoin (gavage à l'eau distillée) et cinq lots tests (gavage aux différentes concentrations de l'extrait hydro-methanolique).

Après administration des différentes doses de l'extrait, l'observation comportementale a été faite après 30 mn, 02h et 04h. L'observation s'est poursuivie pendant 14 jours. Les paramètres suivant ont été observés afin d'évaluer la toxicité sur le plan physique : la modification de la couleur de

la peau, de l'aspect des poils, de la couleur des yeux, les tremblements, les convulsions, la salivation, la diarrhée, le sommeil et le décès. Les animaux ont été pesés tous les jours à la même heure durant l'expérience.

### **3. Potentiel thérapeutique de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp contre la toxicité hépatique, rénale et sanguine induites par le cyclophosphamide**

#### **3.1. Modèles animaux et conception expérimentale**

Des rats mâles de souche *Wistar albinos* (200–250 g) ont été divisés en cinq groupes :

- Un groupe témoin a reçu uniquement le véhicule (L'eau distillée) pendant six jours avec injection intra-péritonéale (i.p.) du NaCl 0.9% le quatrième jour ;

-Un groupe cyclophosphamide a reçu une injection unique intra-péritonéale (i.p.) de cyclophosphamide (200 mg/kg) au quatrième jour ;

- Un groupe de l'extrait de la plante *Centaurium* sp a reçu une dose orale quotidienne (300 mg/kg) de l'extrait hydro méthanolique pendant six jours ;

-Un groupe a été prétraité avec l'extrait de la plante *Centaurium* sp (300 mg/kg par jour du premier au sixième jour) suivi d'une injection intra-péritonéale (i.p.) de cyclophosphamide (200 mg/kg) le quatrième jour.

-Un groupe a été prétraité avec la vitamine E (300 mg/kg par jour du premier au sixième jour) suivi d'une injection intra-péritonéale ( i.p.) de cyclophosphamide (200 mg/kg) le quatrième jour.

Après une période de traitement de six jours, plus précisément le septième jour, les rats ont été soumis à une période de jeûne d'au moins 12 heures. Chaque groupe de rats a reçu une anesthésie à chloroforme, après quoi des échantillons de sang ont été rapidement prélevés via la veine porte. Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes étiquetés contenant l'anticoagulant EDTA ou de l'héparine.

Par la suite, les rats ont subi des procédures sacrificielles au cours desquelles le foie extrait de chaque rat a été pesé puis divisé en deux portions distinctes. Les composants initiaux ont été homogénéisés, centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min à 4 °C. La couche supérieure résultante a été utilisée dans le but d'estimer les paramètres du stress oxydatif.

D'autre part, une partie du foie a été immergée dans une solution de formol (10 %) dans le but de réaliser un examen histologique.

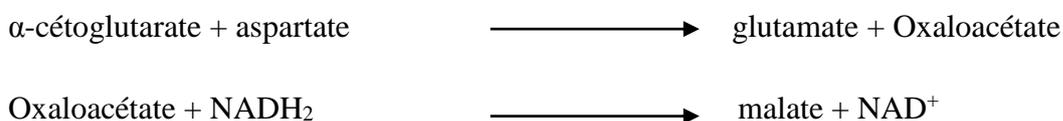
Les échantillons de sang héparines ont été centrifugés pendant 15 minutes à 3000 tours par minute (rpm). Le plasma obtenu a ensuite été extrait et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans le but de réaliser les paramètres biochimiques et les échantillons de sang EDTA sont utilisés pour réaliser du NFS : numération et formule sanguine.

### 3.2. Test biochimique pour les fonctions hépatiques et rénales

L'évaluation des paramètres biochimiques est réalisée par des méthodes enzymatiques ou colorimétriques au niveau du laboratoire biochimie de l'hôpital CHU-Constantine, en utilisant des kits commerciales avec un automate multiparamétrique (automate Cobas pro).

#### 3.2.1. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT

L'aspartate aminotransférase (ASAT ou GOT) catalyse le transfert du groupement amine de l'aspartate sur l' $\alpha$ -cétoglutarate en formant une molécule de glutamate et d'oxaloacétate. En présence de  $\text{NADH}_2$  et de malate déshydrogénase (MDH), l'oxaloacétate est réduit en L-malate. Le  $\text{NADH}_2$  est ensuite oxydé en  $\text{NAD}^+$  selon la réaction ci-dessous :



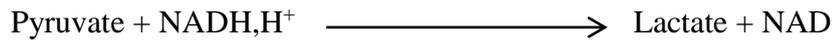
#### 3.2.2. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ALAT

L'alanine aminotransférase (ALAT ou GPT) catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine sur l' $\alpha$ -cétoglutarate formant une molécule de glutamate et pyruvate. En présence de  $\text{NADH}, \text{H}^+$  et de lactate déshydrogénase (LDH), le pyruvate est réduit en L-lactate selon la réaction :



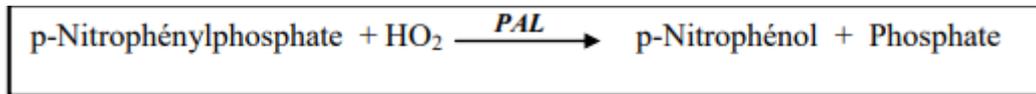
#### 3.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de LDH

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate par le  $\text{NADH}$ . Le taux de la diminution de  $\text{NADH}$  est proportionnel à la concentration catalytique du LDH présent dans l'échantillon.



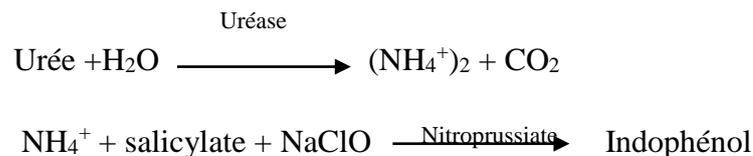
### 3.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate, selon la réaction suivante :



### 3.2.5. Dosage de l'urée plasmatique

L'uréase hydrolyse l'urée en ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). L'ion ammonium réagit ensuite avec le salicylate et l'hypochlorite de sodium dans une réaction catalysée par le Nitroprusside pour donner un composé appelé indophénol de couleur vert. Cette coloration permet de déterminer la présence de l'urée dans les échantillons (Kaplan, 1984).



### 3.2.6. Dosage de la créatinine plasmatique

Le test de la créatinine est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium décrit par JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe de couleur rouge. L'intensité de cette couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans l'échantillon testé (Murray, 1984).

## 3.3. Évaluation biochimique et mesure des paramètres de stress oxydatif

### 3.3.1. Préparation de l'homogénats

Nous avons coupé le foie en petit morceaux, ensuite le foie est homogénéisé avec de KCl (1.15%) et centrifugé. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour réaliser les mesures des paramètres du stress oxydant.

### 3.3.2. Dosage du MDA au niveau de l'homogénat hépatique

Le malondialdéhyde (MDA) est un marqueur fiable de la peroxydation lipidique, il a été mesuré à partir d'homogénats du foie par la méthode de TBARS. 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 du foie 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 et bien agités. 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 tissue (**Uchiyama & Mihara, 1978**).

### 3.3.3. Dosage de glutathion réduit

Le dosage du glutathion réduit du foie (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 foie 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 tissue.

## 4. Technique histologique

La préparation d'une coupe histologique consiste à réaliser des sections, c'est-à-dire des tranches très fines de tissus destinés à être observés au microscope.

Les coupes histologiques ont été réalisées selon la technique classique de Houlot (Houlot, 1984) qui comporte les étapes suivant :

### 4.1. Fixation

La fixation des échantillons a été faite dans le Formol 10%. Le foie de chaque rat est retiré du formol puis coupé à l'aide d'un bistouri afin de réaliser des prélèvements avec une

surface de 2à3 cm<sup>2</sup> et une épaisseur proche de 0.5 mm. Les pièces obtenues sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées qui permet le passage de liquides.



**Figure 23:** Préparation des cassettes des échantillons

La fixation a pour but la conservation des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes activités mitotique et enzymatique. Ainsi que le durcissement de la pièce anatomique (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).

#### 4.2. Déshydratation

Les prélèvements doit d'abord subir une déshydratation par immersion successive dans des bains d'alcool de degré croissante (50% ,70%,90%,100%), pour des durées adaptées (2heurs pour chaque bain) ; puis dans des bains de toluène.

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique (sortie d'eau brutale). Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).



**Figure 24 :** Etape de déshydratation

### 4.3. Inclusion et réalisation des blocs

Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque). Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56°C pendant 4h dans une étuve) et qui infiltre alors toutes les cellules. Après 4 heures d'inclusion, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal « Barres de Leuckart ». Après refroidissement (dans un congélateur pendant toute une nuit), on se trouve alors en présence d'un bloc de paraffine dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est rigide en présence de paraffine solide dans l'espace intracellulaire de chaque cellule composant le tissu (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).

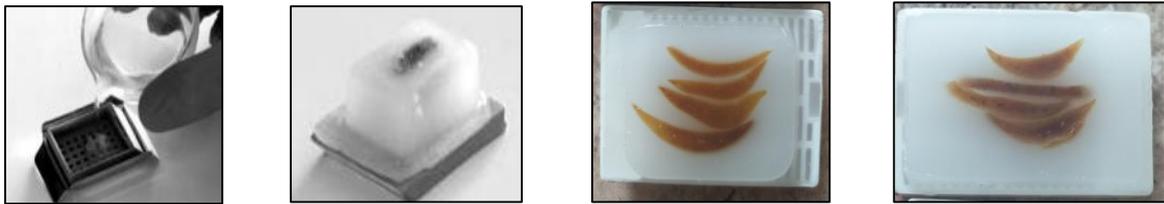


Figure 25 : Préparation des blocs

### 4.4. Confection des coupes histologiques

Le passage du bloc de paraffine dans un microtome permet de réaliser des sections de 2 à 5  $\mu\text{m}$  disposées en séries régulières sous forme d'un ruban

La confection des coupes histologiques comporte alors 3 étapes :

- L'étalement : de segments de ruban de paraffine sur une lame de verre contenant un liquide d'étalement tel que l'eau albumineuse.
- Le collage : les lames de verre sont placées sur une plaque chauffante, réglée à une température de 40°C, pendant 15 min.
- Le séchage de la préparation : en inclinant les lames et en les séchant au moyen de papier buvard absorbant (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).

### 4.5. Déparaffinage

Le déparaffinage consiste, à éliminer la paraffine. Les lames sont placées sur une plaque chauffante (de 45 à 60°C) pendant 15 min. afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine périphérique (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).

#### 4.6. Réhydratation

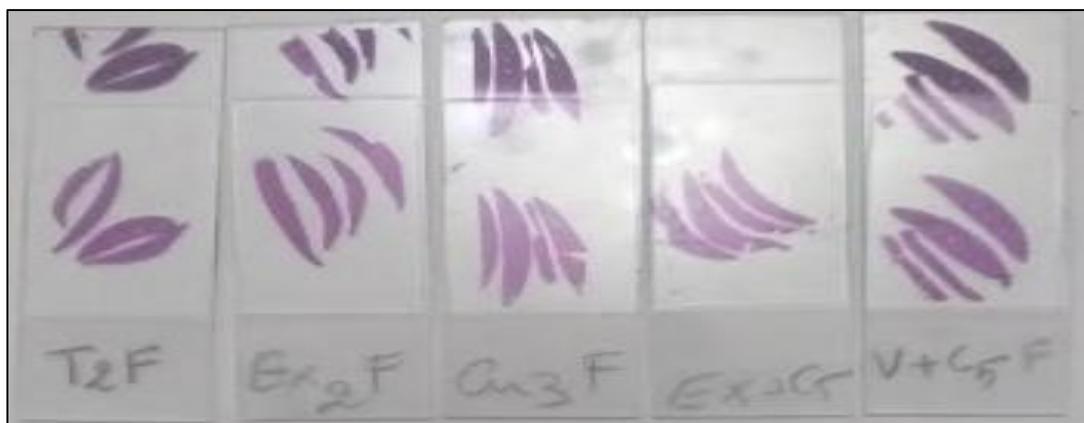
La réhydratation permet l'élimination de la paraffine intracellulaire, en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool à 50°), puis dans de l'eau distillée (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).

#### 4.7. Coloration

Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires (noyau, membrane plasmique et cytoplasme).

La coloration est faite selon la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) selon les étapes suivantes :

1. Immerger dans un bain d'hématoxyline de Harris (15min) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
2. Différencier les coupes dans l'alcool acide, puis les rincer à l'eau de robinet en suite vérifier la différenciation au microscope.
3. Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
4. Immerger dans un bain d'Eosine (15secondes à 2min) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme) en rose.
5. Enfin, déshydrater, éclaircir et monter les prélèvements entre lame et lamelle puis passer à l'observation au microscope optique ou photonique (Fiche technique, service anatomie-pathologie, CHU Constantine).



**Figure 26** : Coupes histologiques après coloration

### 5. Etude statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyens  $\pm$  écarts-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test  $t$  de Student.

## II. Résultats

### 1. Détermination du rendement

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* représente un rendement de 37 % par rapport à la matière végétale sèche.

### 2. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux

Les résultats obtenus montrent la richesse de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* en polyphénols et en flavonoïdes, dont la teneur représente  $78,00 \pm 9 \mu\text{g}$  d'équivalents d'acide gallique/mg d'extrait et  $41,3 \pm 6,19 \mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine /mg d'extrait respectivement.

### 3. Activité Antioxydant de la Plante *Centaurium sp* (Test de DPPH')

La méthode de piégeage du radical libre DPPH est largement utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits végétaux. Dans cette technique, l'effet antioxydant peut être facilement évalué en suivant la diminution de l'absorption de DPPH à 517 nm. Nos résultats représentés sur le Tableau 2 montrent que l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* est capable de piéger le radical DPPH en fonction de ses concentrations, et son activité atteint plus de 86 % à 200  $\mu\text{g/ml}$ . La valeur  $\text{IC}_{50}$  calculée indique que l'activité de notre extrait ( $\text{IC}_{50} = 115,89 \pm 3,58 \mu\text{g/ml}$ ) est plus élevée par rapport à la vitamine E ( $\text{IC}_{50} = 13,02 \pm 5,17 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tableau 2 :** Activité antiradicalaire d'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* et de la Vitamine E sur le radical libre DPPH.

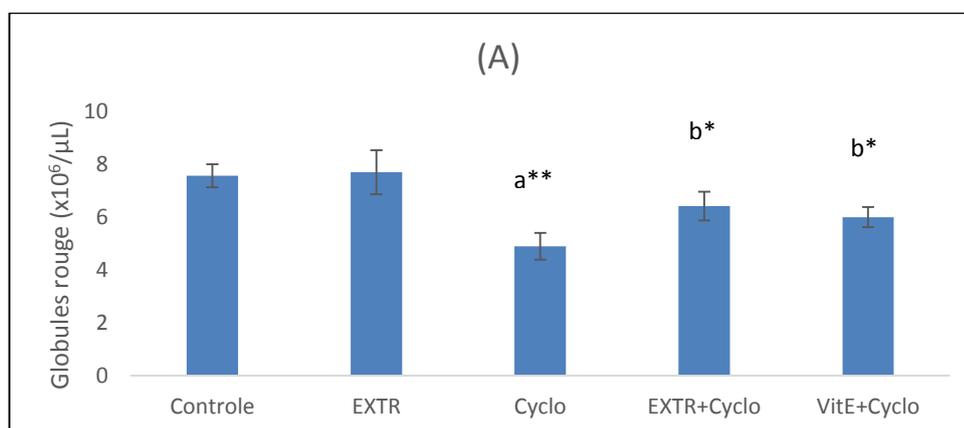
Concentration	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Extrait</b>	$6,72 \pm 0,67$	$11,36 \pm 0,3$	$21,37 \pm 0,3$	$47,25 \pm 0,1$	$86,99 \pm 0,4$	$115,89 \pm 3,5$
<b>Vitamine E</b>	$36,21 \pm 1,6$	$82,53 \pm 1,5$	$89,24 \pm 0,1$	$89,48 \pm 0,1$	$89,55 \pm 0,2$	$13,17 \pm 4,11$
<b>n</b>	6	4	3	8	0	8

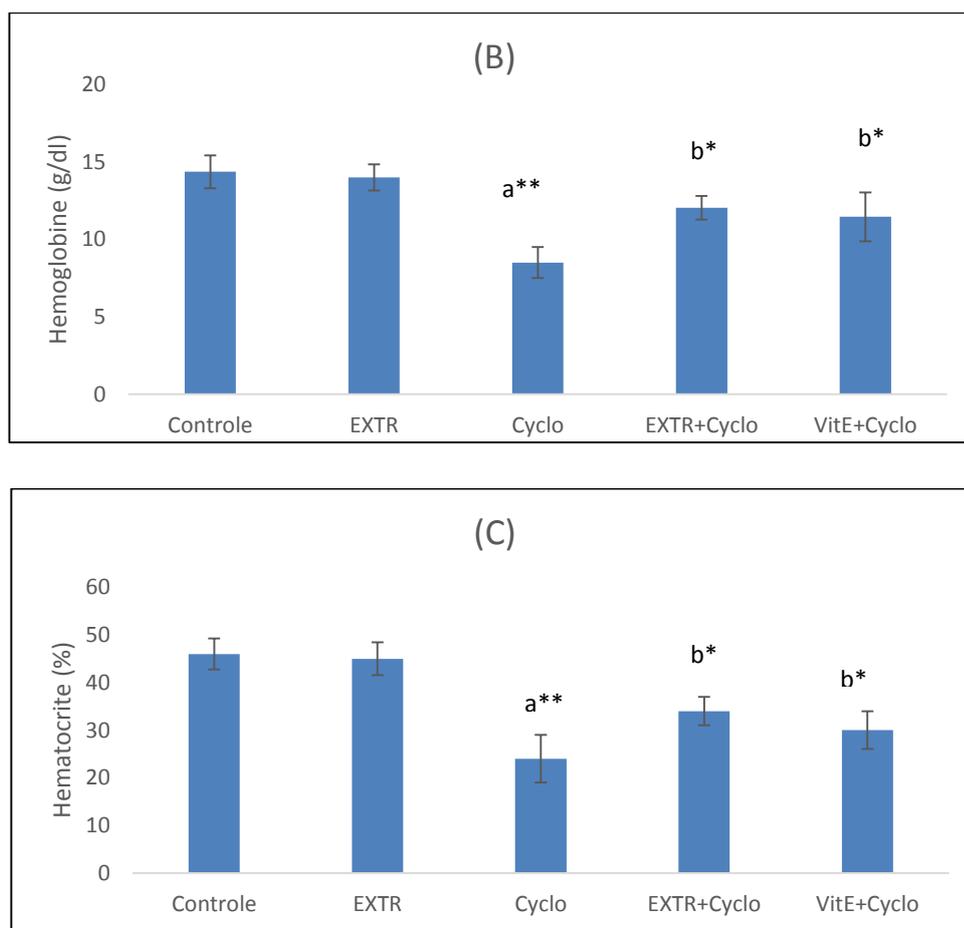
#### 4. Toxicité aiguë de de la Plante *Centaurium sp*

L'administration orale de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* à des doses de 250, 500, 1000, 2000 et 5000 mg/kg n'a montré aucun effet nocif marqué sur les animaux testés. Aucun décès n'a été enregistré. La dose létale médiane (DL<sub>50</sub>) a été déterminée comme étant supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel. Dans l'ensemble, il n'y avait aucune indication marquée de toxicité ou de changements physiologiques.

#### 5. Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres hématologiques

Le sang des rats a été estimé pour divers paramètres hématologiques, à savoir la teneur en globules rouges, l'hémoglobine et l'hématocrite, et l'effet de l'extrait hydro méthanolique de *Centaurium sp*, le Cyclophosphamide et la vitamine E sur ces paramètres a été présenté dans la figure 28. Chez les rats traités au cyclophosphamide, on note une réduction significatif ( $p < 0,01$ ) des globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite par rapport au groupe témoin normal. Ceci suggère une anémie hématotoxique chez les rats traités au cyclophosphamide. Cependant, ces variations des paramètres sanguins chez les rats traités avec l'extrait hydro méthanolique de *Centaurium sp* et la vitamine E se sont améliorées de manière significative ( $p < 0,05$ ).

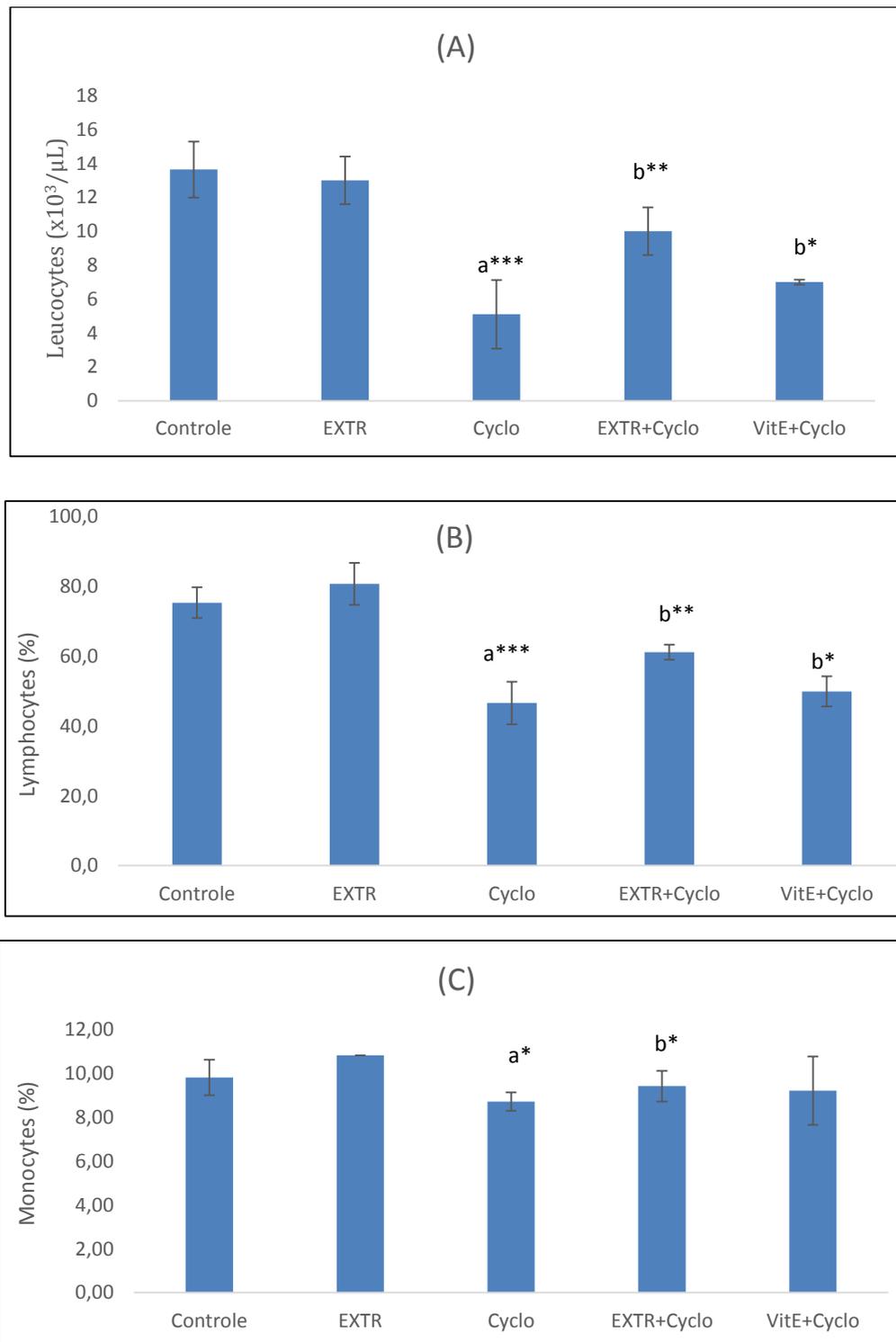




**Figure 27:** Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres hématologiques. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide..

## 6. Effet de l'extrait hydrométhanolique de *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le nombre total et différentiel de leucocytes

L'effet de l'extrait hydro méthanolique de *Centaurium sp* sur le nombre total et différentiel de leucocytes a été montré dans la figure 29. Chez les rats traités au cyclophosphamide, une réduction significative du nombre global de leucocytes ( $p < 0,001$ ), en particulier de monocytes ( $p < 0,05$ ) et de lymphocytes ( $p < 0,001$ ), a été observée par rapport au nombre total de leucocytes de groupe témoin normal. Le traitement avec de l'extrait hydro méthanolique de *Centaurium sp* a cependant contribué à une augmentation significative du nombre de leucocytes ( $p < 0,01$ ), lymphocytes ( $p < 0,01$ ) et monocytes ( $p < 0,05$ ) par rapport aux rats traités avec le cyclophosphamide seul. Une augmentation très significative du nombre de leucocytes ( $p < 0,05$ ) a également été observée chez les rats traités par la vitamine E.

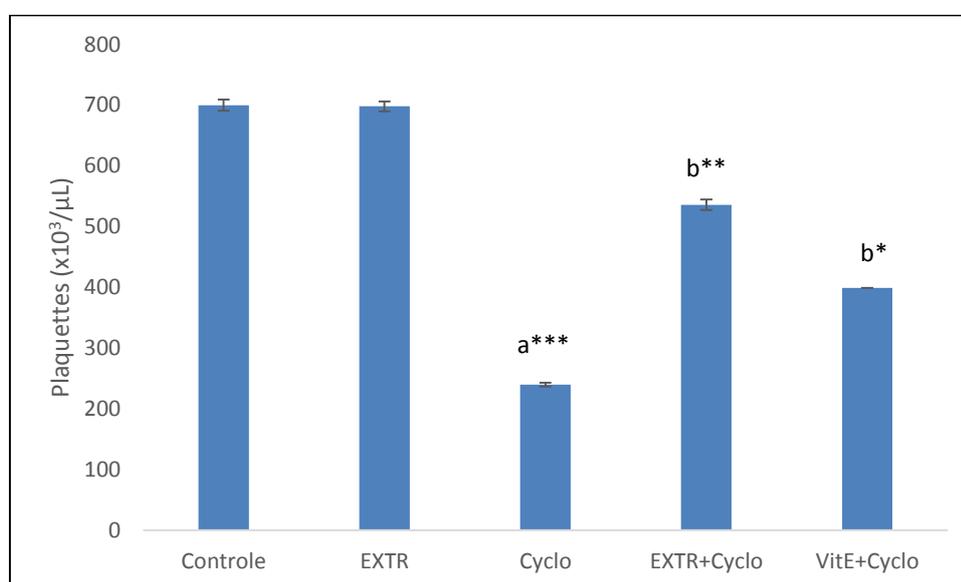


**Figure 28** : Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le nombre total et différentiel de leucocytes. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.00$  a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide..

### 7. L'effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le nombre des plaquettes

La figure 30 montre l'effet de différents traitements sur le nombre de plaquettes (PL). Les résultats de cette étude ont montré que le cyclophosphamide réduisait significativement le nombre de PL au cours de l'expérience par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ).

Dans les groupes de traiter par l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* et la cyclophosphamide on observe un effet très substantiel dans la mesure où il a entraîné une augmentation significative de nombre des plaquettes par rapport au groupe CP ( $p < 0,01$ ). Le groupe traiter par l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* seul n'a pas modifié ce facteur et n'a présenté aucune différence significative par rapport au groupe témoin.

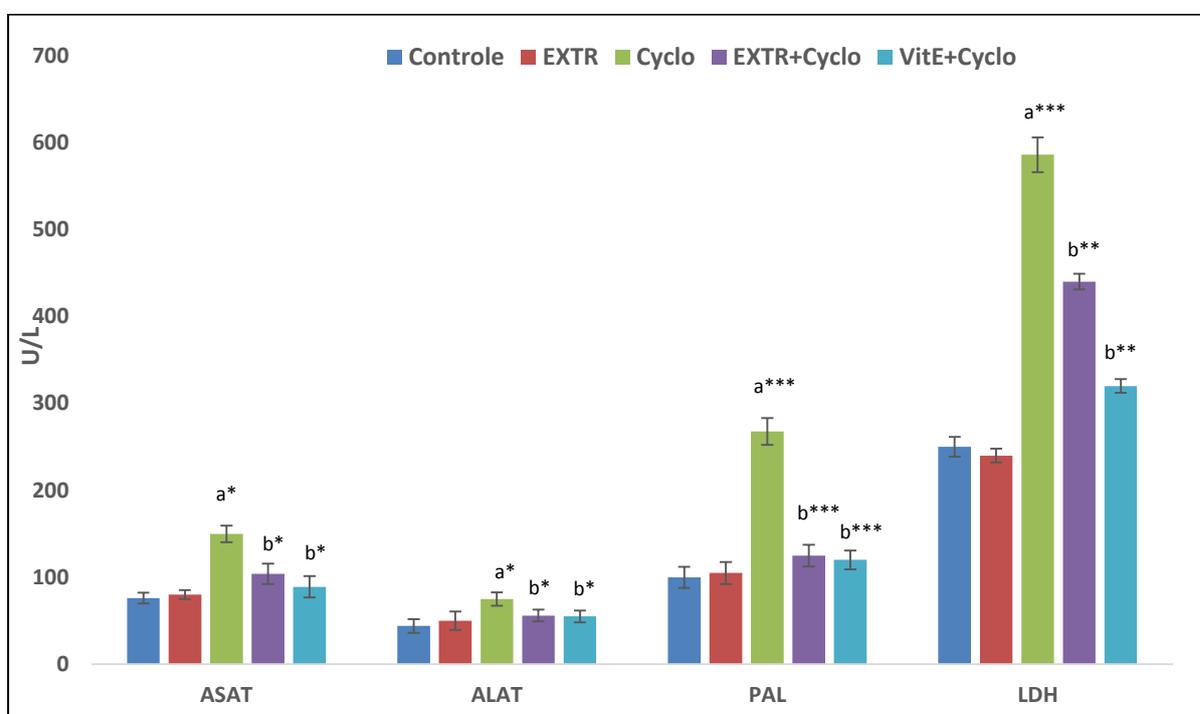


**Figure 29:** Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le nombre des plaquettes. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide..

### 8. Effets de la l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur la fonction hépatique

Les activités des marqueurs de la fonction hépatique aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), la phosphatase alcaline (ALP) et lactate dehydrogenase (LDH) ont été évaluées dans le sérum (Figure 31) et leurs taux dans les groupes contrôle et de l'extrait de *Centaurium sp* étaient assez similaires et, par conséquent, statistiquement non significatifs. Alors que les rats traités au cyclophosphamide ont montré des taux

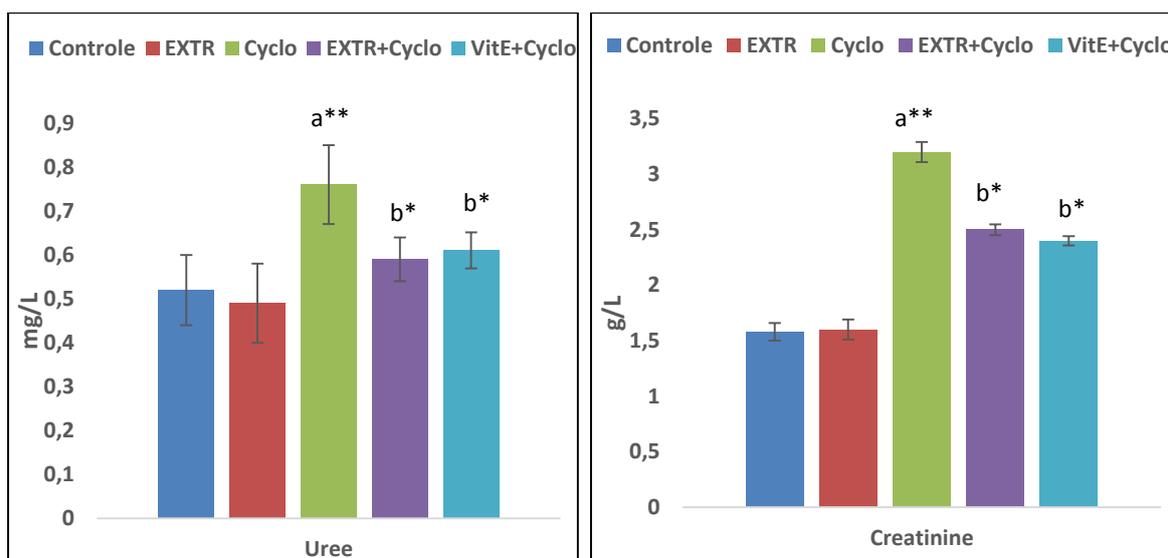
significativement plus élevés d'ALAT ( $P<0,01$ ), d'ASAT ( $P<0,01$ ) et d'ALP ( $P<0,001$ ) et du LDH ( $P<0,001$ ) par rapport aux groupes témoins. Ces marqueurs ont chuté de façon significatif après le traitement à l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp et la vitamine E [d'ALAT ( $P<0,01$ ), d'ASAT ( $P<0,05$ ) et d'ALP ( $P<0,001$ ) et du LDH ( $P<0,01$ )].



**Figure 30** : Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres hépatiques. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide.

### 5. Effets de la l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp de cyclophosphamide et de la vitamine E sur la fonction rénale

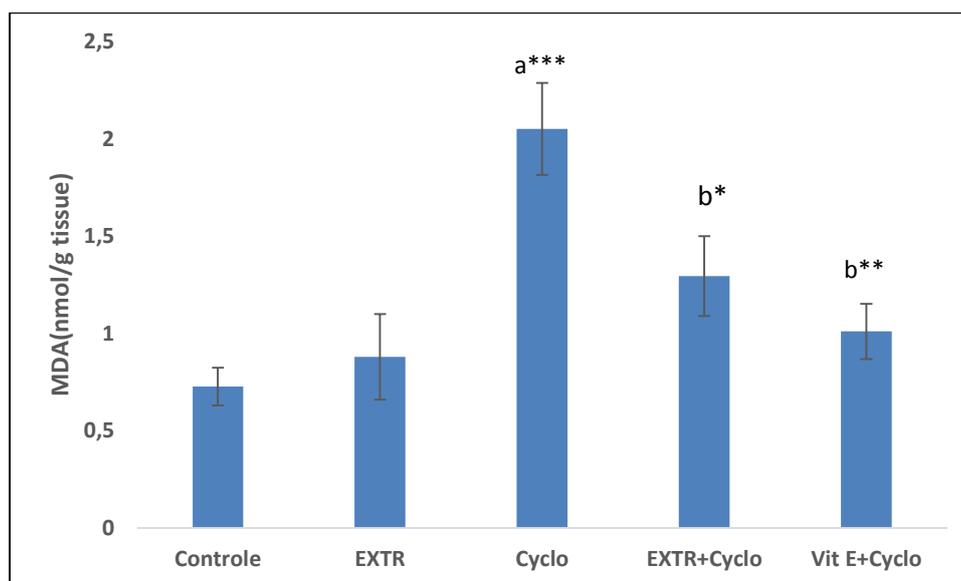
La figure 32 montre que les taux sériques de l'urée et de la créatinine sont significativement élevés ( $p<0,01$ ) dans le groupe traité par le cyclophosphamide par rapport au groupe témoin. Cependant, le prétraitement par l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp ou la vitamine E a réduit significativement les niveaux d'urée et de la créatinine par rapport au groupe traité le cyclophosphamide ( $p < 0,05$ ) (Figure 32)



**Figure 31** : Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur les paramètres rénaux. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide.

#### 10. Effets de la l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le stress oxydative hépatique

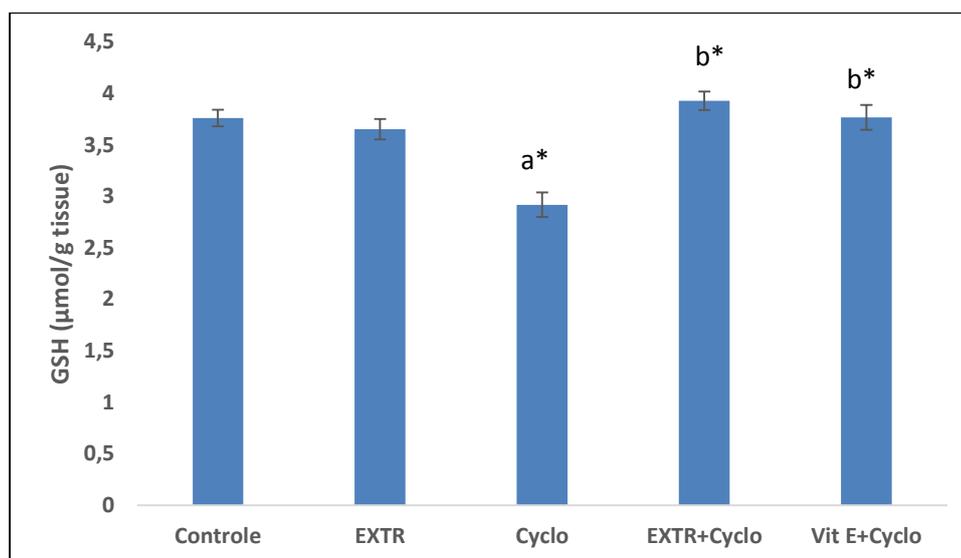
Les effets de la vitamine E ou l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* sur l'état de stress oxydatif des cellules hépatiques ont été évalués par la mesure du niveau de MDA, un biomarqueur de la peroxydation lipidique. Le cyclophosphamide (200 mg/kg) a augmenté de manière significative ( $p < 0,001$ ) le niveau de MDA hépatique par rapport au groupe témoin. Tandis que le prétraitement avec la vitamine E (300 mg/kg) ou l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* (300 mg/kg) ont significativement diminué le niveau de la MDA ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ , respectivement) dans les hépatocytes lorsqu'il est comparé au foie de rats du groupe cyclophosphamide seul (Figure 33).



**Figure 32:** Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique des membranes des cellules hépatiques. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide

### 11. Effets de l'extrait hydro-méthanolique de la plante *Centaurium sp*, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur la variation de glutathion (GSH) dans les cellules hépatiques

Comme le montre la figure 3, l'exposition au cyclophosphamide (200 mg/kg, injection intrapéritonéale) a réduit de manière significative ( $p < 0,05$ ) la teneur en GSH d'environ 35% par rapport au groupe témoin. De plus, le prétraitement avec la vitamine E a provoqué une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la teneur en GSH, par rapport au groupe exposé au cyclophosphamide. Le groupe prétraité avec du l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium sp* (300 mg/kg) a démontré une augmentation significatives ( $p < 0,05$ ) de la teneur en GSH par rapport au groupe exposé au cyclophosphamide.



**Figure 33:** Effet de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp, le cyclophosphamide et la vitamine E sur la teneur en GSH des cellules hépatiques. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student: \* $p < 0.05$  ; a : comparativement au groupe témoin b : comparativement au groupe traité par le cyclophosphamide.

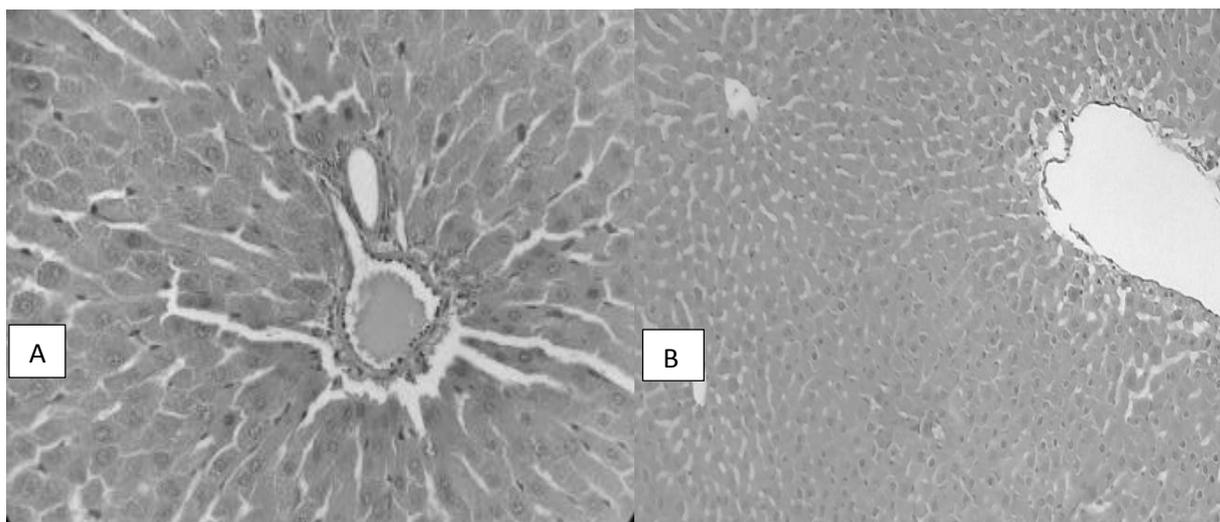
## 12. Évaluation histopathologique des effets de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp, de cyclophosphamide et de la vitamine E sur le foie

L'examen histopathologique des sections hépatiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) obtenues à partir des rats témoins a révélé une structure histologique normale (Tableau 3 ; Figure 35). L'examen des coupes obtenues à partir du groupe cyclophosphamide a montré une perte sévère de l'architecture hépatique (congestion, nécrose, dilatation des sinusoides et inflammation) (Tableau 3 ; Figure 35). Un prétraitement avec de la vitamine E (300 mg/kg) a montré un effet protecteur significatif sur l'architecture tissulaire (Tableau 3). L'effet hépatoprotecteur de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp a été confirmé par analyse histologique. En effet, l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp (300 mg/ml) a exercé des effets protecteurs similaires à la vitamine E et améliore significativement les effets du cyclophosphamide (Tableau 3). L'architecture du foie est conservée chez 60% des animaux traités avec 300 mg/kg de l'extrait hydro méthanolique de la plante *Centaurium* sp et de la vitamine E.

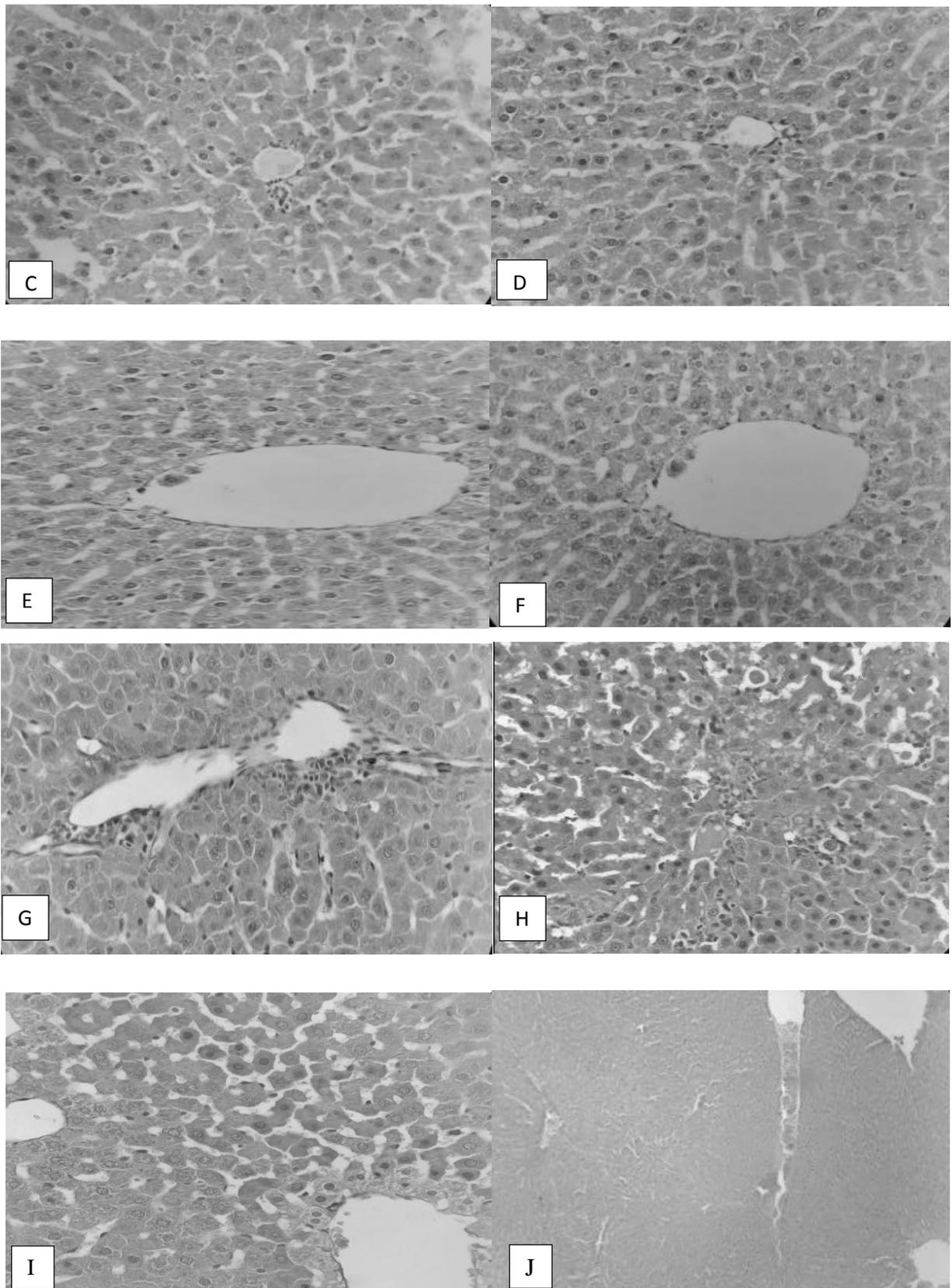
**Tableau 3:** Effets de l'extrait hydro méthanolique de la plante Centaurium sp et de la vitamine E sur les modifications histopathologiques provoqué par le cyclophosphamide au niveau du foie

Modifications histopathologiques	Controle	Extr	Cyclo	Extr+Cyclo	Vit E+Cyclo
<b>Congestion</b>	-	+/-	+++	+/-	+
<b>Nécrose</b>	-	-	+++	+	+
<b>Sinusoïdes dilaté</b>	-	-	+	-	-
<b>Inflammation</b>	-	-	+++	+	+/-

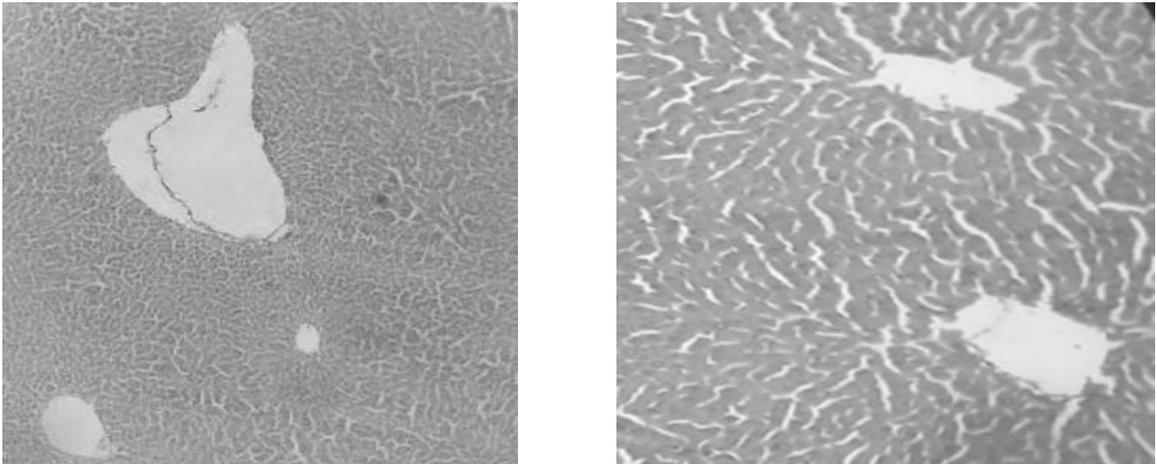
(-) : Aucun changement histopathologique significatif ; (+/-) : degré léger ; (+) : Degré modéré ; (+++) : Degré sévère



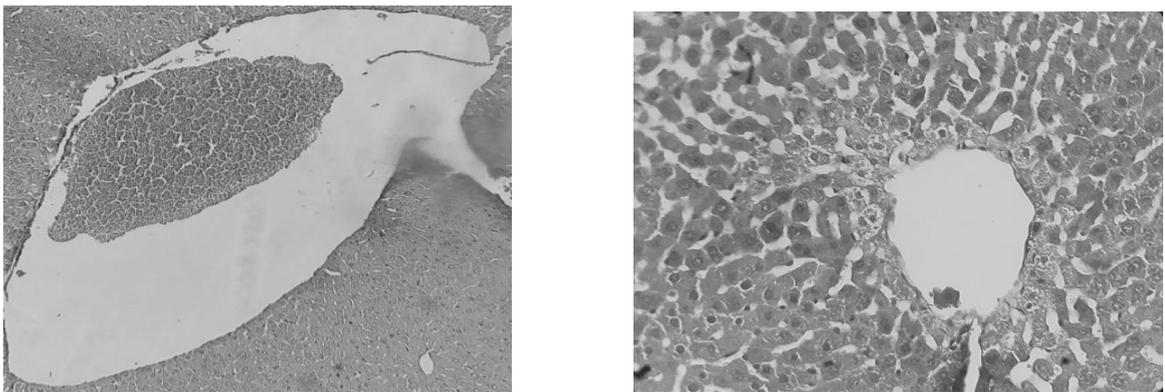
**Figure 34:** Coupe histologique des rats témoins en utilisant une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). (A, B) représente l'histologie normale des rats témoins sans aucun changement ( $\times 400$  ;  $\times 100$ , respectivement).



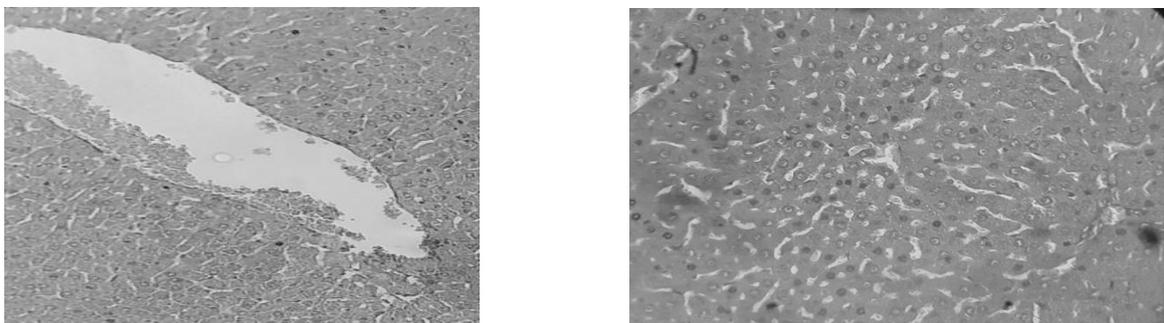
**Figure 35** : Modifications histopathologiques du foie des rats traité par le cyclophosphamide.



**Figure 36** : Coupes histologiques des rats traités par l'extrait de Centaurium sp Aspect normal ( x10 x40 respectivement)



**Figure 37** : Coupes histologique des rat prétraités par vitamine E avec du cyclophosphamide( congestion + nécrose minime x10 x40 respectivement)



**Figure 38** : Coupe histologique des rats prétraités par l'extrait avec cyclophosphamid (congestion et capillarisation des sinusoides x10, x40)

### III. Discussion

Actuellement, les produits phytochimiques et les plantes médicinales prennent une importance considérable dans le domaine des soins de santé, car les humains recherchent des remèdes sûrs et efficaces. Les plantes contiennent des composés actifs qui diffèrent par leur structure et leurs effets biologiques. L'effet biologique des extraits de plantes est généralement dû à la présence de polyphénols, notamment des flavonoïdes. Ces composés sont considérés comme des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal et caractérisés par leurs propriétés efficaces en tant qu'antioxydants en raison de sa capacité à donner un atome d'hydrogène via des groupes hydroxyle (**Sun & Shahrajabian, 2023**) ; Il serait donc utile de déterminer la quantité de phénols totaux présents dans les extraits de plantes.

Afin d'identifier la teneur en substances actives dans l'extrait hydro méthanolique de *Centaurium* sp, la détermination quantitative des phénols et des flavonoïdes dans l'extrait hydro méthanolique a été étudiée en utilisant respectivement la méthode Folin-Ciocalteu et la méthode au chlorure d'aluminium  $AlCl_3$ . Les résultats ont montré que l'extrait hydrométhanolique est riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. La quantité de phénols et de flavonoïdes pour l'extrait a été estimée à  $(78,00 \pm 9 \mu\text{g d'équivalents d'acide gallique/mg d'extrait et } 41,3 \pm 6,19 \mu\text{g d'équivalents de quercétine/mg d'extrait respectivement})$ , et donc la présence d'une quantité significative de phénols dans les extraits de *Centaurium* sp indiquent sa haute teneur en antioxydants (**Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2009**). Nos résultats sont en accord avec les études de Siler et al. (2014) qui ont montré la richesse des extraits méthanolique de parties aériennes et de racines de cinq espèces de centaurées (*Centaurium erythraea*, *C. tenuiflorum*, *C. littorale ssp. uliginosum*, *C. pulchellum* et *Schenkia spicata*) en phénols et en flavonoides. Et ils ont observé une corrélation entre les valeurs de l'activité antioxydants des Centaurées et quantité de phénols et des flavonids.

Les antioxydants deviennent de plus en plus intéressants pour les scientifiques du domaine alimentaire et les professionnels de la santé en raison de leur rôle protecteur dans les produits alimentaires contre la détérioration oxydative et dans l'organisme contre les processus pathologiques induits par le stress oxydatif. Une recherche efficace sur les sources naturelles d'antioxydants et le développement de nouveaux composés antioxydants nécessitent des méthodes fiables d'évaluation de l'activité antioxydante (**Chaudhary et al., 2023**).

L'activité antioxydante de ces extraits a été étudiée grâce au test DPPH, qui est un radical libre très stable de couleur violet foncé. Le violet devient jaune, dans la présence des antioxydants. Les résultats du test DPPH ont été exprimés avec des valeurs IC<sub>50</sub>, où une faible valeur IC<sub>50</sub> indique une activité antioxydante hautement significative. Nos résultats, ont montré que l'activité antioxydante de l'extrait est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait (Tableau 2) donc l'activité antioxydant de l'extrait est dose dépendante. Cette activité est attribuée à la qualité et la quantité des phénols et des flavonoïdes contenus dans l'extrait, ce dernier a montré une activité modérée par rapport à la vitamine E (Tableau 2). Ce résultat est en accord avec certains rapports précédents (Siler et al., 2014 ; Božunović et al., 2023).

Le nombre de patients atteints de divers types de cancer augmente chaque jour, conduisant au développement de grandes quantités de médicaments anticancéreux. Les résultats cliniques associés à ces médicaments sont cependant limités par leurs effets secondaires indésirables (Patra et al., 2012). Par conséquent, des thérapies adjuvantes spécifiques sont nécessaires pour réduire les effets secondaires de ces médicaments sans interférer avec leurs propriétés anticancéreuses. Aujourd'hui, une plus grande attention est accordée aux molécules bioactives naturelles car elles possèdent un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-apoptotique important (Wang et al., 2018).

Le cyclophosphamide (CPM) est l'un des médicaments anticancéreux les plus myélotoxiques, provoque un stress oxydatif et une inflammation sévères et modifie l'activité hématopoïétique de la moelle osseuse en produisant des espèces réactives de l'oxygène et des cytokines inflammatoires (Iqbal et al., 2018). Ainsi, une partie de la présente étude a été conçue pour explorer le pouvoir hématoprotecteur de *Centaurium* sp chez des rats *Wistar albinos* vis avis la toxicité hématologique induite par le CPM. La présente étude a révélé une hématoprotection et une amélioration significatives de la toxicité hématologique, via la formule sanguine totale (FNS).

L'hématotoxicité est l'un des nombreux facteurs responsables de limiter le pronostic des néoplasmes (Kameo et al., 2021). L'un des mécanismes les plus rapportés d'hématotoxicité induite par le CPM est l'effet inhibiteur du CPM ou de son métabolite (acroléine) sur la réplication de l'ADN, provoquant des dommages oxydatifs et inhibant la fonction hématopoïétique des cellules de la moelle osseuse (par exemple, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices hématopoïétiques) produisant des cellules du sang périphérique (Liu et al., 2014). Par conséquent, la mesure du nombre de cellules sanguines

périphériques reflète directement la fonction hématopoïétique (Tian et al., 2021). Conformément aux études précédentes (El-Naggar et al., 2015 ; Iqubal et al., 2020 ; Okafor et al., 2024), l'administration de CPM à 200 mg/kg i.p. a entraîné une diminution significative des taux de globules rouges, d'hémoglobine, d'hématocrite, de leucocytes et de Plaquettes ; une indication d'anomalies hématologiques, dues à une diminution des cellules du sang périphérique. Cependant, ces réductions ont été atténuées dans une certaine mesure lors du prétraitement avec l'extrait de *Centaurium* sp à raison de 300 mg/kg pendant 7 jours consécutifs, ce qui suggère que *Centaurium* sp possède des stimulants potentiels capables d'améliorer l'hématopoïèse. Nos résultats sont en accord avec les études de Fatema et al. (2020) qui ont montré que *Moringa oleifera* (Sajna) a un rôle préventif contre l'anémie induite par le CPM.

Nos résultats peuvent suggérer que le CPM supprime la capacité de la moelle osseuse à en produire de nouvelles cellules, entraînant une diminution du nombre de cellules sanguines, ce qui entraîne une diminution du pourcentage d'Hb dans le sang. Les modifications du taux de cellules sanguines induites par le CPM dans cette étude étaient similaires à celles observées chez l'homme pendant le traitement par ce médicament. Les anomalies les plus courantes observées chez l'homme sont la leucopénie et l'anémie ; une thrombocytopénie est observée après des traitements plus longs (Emadi et al., 2009). Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat après une dose intrapéritonéale unique de CPA (50 mg/kg) : des diminutions significatives du nombre de leucocytes et de la concentration en hémoglobine ont été notées (Chang et al., 2009). L'anémie induite par la chimiothérapie est l'un des effets secondaires les plus courants ressentis par les patients atteints de cancer, survenant chez environ 70 à 90 % des personnes suivant un traitement pour la maladie (Groopman & Utri, 1999).

Le CPM est un immunosuppresseur qui alkyle l'ADN, interférant ainsi avec sa synthèse et sa fonction, en particulier dans les lymphocytes en prolifération (également dans les lymphocytes non en prolifération) (Mythili et al., 2004). Le CPA est connu comme un médicament immunosuppresseur, de sorte que le groupe CPM a présenté une diminution très significative du nombre total de lymphocytes tout au long de la période expérimentale par rapport au groupe témoin. Cela pourrait être attribué à une dépression sévère de la moelle osseuse qui se manifeste par une diminution significative de tous les types de cellules sanguines, une lymphopénie, et une monocytopenie. Ces résultats sont en accord avec ceux de Latha & Panikkar (1999) qui ont rapporté une leucopénie chez des souris traitées au CPM. De plus, Holly et al. (2003) ont enregistré une leucopénie, une lymphopénie et une neutropénie chez des rats femelles traités au CPA pendant 30 jours. Unni & Martinus (2002) ont rapporté une

lymphopénie significative chez les rats traités avec une dose unique de CPA (250 mg/kg de poids corporel), **Zuluaga et al. (2006)** qui ont rapporté que l'injection i.p. à des souris femelles de 150 et 100 mg/kg de CPA aux 1<sup>er</sup> aux 4<sup>ème</sup> jours, entraînant respectivement une leucopénie, une lymphopénie, une neutropénie et une monocytopenie.

Chez le rat, le CPM a un effet immunotoxique sur les lymphocytes du sang. En accord avec les résultats d'études précédentes de **Wang et al. (2012)** et **Yu et al. (2014)**, le traitement au CPM a nettement diminué le nombre de globules rouges, de globules blancs, d'hémoglobine et de plaquettes périphériques. Nous avons observé que *Centaurium* sp a rétabli les numérations périphériques des globules rouges, des leucocytes, d'hémoglobine et des plaquettes, ce qui suggère que *Centaurium* sp pourrait protéger contre la myélosuppression induite par le CPM.

Le CPM est utilisé comme médicament chimiothérapeutique pour la survie des patients atteints de cancer, mais son hépatotoxicité ne peut être ignorée car elle comporte toujours des complications et des défis. Les stratégies chimiothérapeutiques actuelles doivent être complétées par des antioxydants naturels pour prévenir l'hépatotoxicité (**Sherif, 2018**). Dans cette étude, l'effet hépato protecteur de *Centaurium* sp est étudié pour déterminer les mécanismes de protection potentiels associés au stress oxydatif contre l'hépatotoxicité induite par le CPM.

Un dysfonctionnement hépatique lié à la chimiothérapie peut être le résultat de différents mécanismes tels que la génération d'espèces réactives de l'oxygène (**Sangeetha et al., 1990**) au cours du métabolisme du médicament qui forment un adduit avec une biomolécule, inhibe l'activité mitochondriale avec une accumulation de la peroxydation lipidique et des espèces réactives de l'oxygène, perturbe la membrane biologique, et génère une réponse inflammatoire et l'apoptose (**Iqbal et al., 2019; Turedi et al., 2023; Ola & Odunola, 2023**).

L'administration de CPM provoque différents types d'aberrations dans le foie allant de la destruction de l'architecture membranaire à l'altération des indices biochimiques jusqu'à la perturbation du statut antioxydant (**Althunibat et al., 2023**). En général, le stress oxydatif résultant d'un déséquilibre entre le statut oxydant et antioxydant est connu pour être un facteur crucial responsable de la perturbation de la santé des systèmes biologiques. Par conséquent, pour traiter les maladies du foie, de nombreuses recherches ont souligné l'importance des composés ayant un potentiel antioxydant qui peuvent inhiber les lésions hépatiques en éliminant les radicaux libres (**Sherif, 2018**).

En règle générale, les activités de l'ALT et de l'AST sont couramment utilisées pour évaluer la fonction hépatique, l'AST étant un indicateur sensible et éprouvé d'un problème mitochondrial, en particulier dans la zone centrolobulaire du foie, et l'activité de l'ALT étant plus précise dans la surveillance de l'état hépatocellulaire. L'étendue des dommages au foie est évaluée par le niveau de ces transaminases cytoplasmiques libérées dans la circulation (**Boone et al., 2005 ; Ramaiah et al., 2007**) et l'augmentation de l'activité de ces enzymes cytoplasmiques est donc considérée comme un indicateur de trouble hépatique (**Mecheri et al., 2024**). Dans cette étude, les activités de l'AST et de l'ALT dans le plasma ont augmenté suite à l'administration de CPM, ce qui peut être dû à des lésions hépatiques entraînant une augmentation du taux de synthèse et/ou de la libération d'enzymes fonctionnelles des membranes biologiques (**Ola & Odunola, 2023**). L'élévation des activités de ces enzymes est une indication d'une lésion hépatique ou d'une perturbation de l'histoarchitecture, comme observé dans le foie de rats recevant exclusivement du CPM sur la figure 36. De plus, le lactate déshydrogénase (LDH) est une oxydoréductase tétramère qui catalyse de manière anaérobie la conversion de l'acide pyruvique en acide lactique et vice versa. L'estimation de la LDH en plus des tests de base de la fonction hépatique comme les activités de l'ALT, de l'AST et de l'ALP augmentent la précision du diagnostic des maladies du foie (**Ramaiah et al., 2007**). L'estimation de la quantité de production de LDH dans les hépatocytes est utilisée pour détecter une insuffisance hépatique aiguë (**Kotoh et al., 2011**). Par conséquent, l'augmentation de l'activité LDH suite à l'administration de CPM a confirmé l'effet hépatotoxique du CPM dans ce présent travail. Cependant, ces augmentations de l'activité LDH et des transaminases ont été significativement réduites par le traitement avec *Centaurium* sp ou la vitamine E. Il a été démontré que les activités des aminotransférases sériques sont réduites significativement par rapport au groupe toxique (traiter par le CPM) à mesure que les hépatocytes se régénèrent et que le parenchyme hépatique guérit (**Mroueh et al., 2004 ; Hasan et al., 2020**), ce qui correspond au résultat histopathologique obtenu sur la figure 38. Par conséquent, ces résultats suggèrent que *Centaurium* sp et la vitamine E ont empêché l'hépatotoxicité induite par le CPM.

Des rapports ont établi une association entre le stress oxydatif et les lésions hépatiques (**Alqahtani et al., 2016 ; Mohammed et al., 2020**). La plupart des agents alkylants, en particulier le CPM, possédaient un caractère pro-oxydant et généraient donc des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui appauvrissaient les thiols cellulaires et les enzymes antioxydantes (**El-Beheiry et al., 2023**). Nos résultats ont montré que le CPM provoquait une réduction significative de la glutathion avec une augmentation concomitante de la peroxydation

lipidique. Dans cette étude, le prétraitement des animaux traités au CPM avec un extrait de *Centaurium* sp ou la vitamine E a réduit la peroxydation lipidique et amélioré le teneur du GSH dans le foie du rat. Cela montre que l'extrait peut améliorer l'activité antioxydante hépatique en préservant sa teneur en protéines surfydryl. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Dorđević et al. (2022)** qui ont observé le rôle de *Centaurium erythraea* dans l'amélioration de la fonction hépatique et rénale en stimulant le système antioxydant endogène. L'observation peut être étayée par la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes dans la plante qui ont contribué aux activités antioxydantes de certaines espèces de *Centaurium* sp (**Šiler & Mišić ; 2016 ; El Menyiyet al., 2021**).

Les résultats biochimiques ci-dessus ont également été confirmés par des changements histopathologiques. Les coupes de foie obtenues chez les rats traités au CPM ont révélé une dégénérescence étendue, une infiltration cellulaire inflammatoire significative et une nécrose de la majorité du parenchyme hépatique. À l'inverse, aucun changement histologique n'a été observé dans les coupes de tissus du groupe traité avec *Centaurium* sp seul. Il est intéressant de noter que les coupes hépatiques des deux groupes traités par la vitamine E ou par *Centaurium* sp et le CPM ressemblaient presque à celles du groupe témoin normal. Ce resultat est en accord avec les travaux de **Mroueh et al. (2004)**. En conclusion, l'extrait de *Centaurium* sp offrait un potentiel protecteur similaire à la vitamine E contre les effets secondaires toxiques du CPM induits par le stress oxydatif sur le foie du rat.

Il a été récemment démontré que l'administration de CPM pouvait endommager les cellules rénales. Les rapports de plusieurs études révèlent le potentiel protecteur des plantes médicinales sur la toxicité de plusieurs agents anticancéreux synthétiques (**Devi et Mazumder, 2016**). Cela peut être dû au potentiel antioxydant des composés bioactifs des plantes médicinales. Ainsi, cette étude se concentre sur l'effet protecteur de *Centaurium* sp contre les dommages induits par le CPM sur les organes rénaux chez le rat.

Afin de vérifier l'effet protecteur *Centaurium* sp dans les lésions rénales induites par le CPM, des marqueurs de néphrotoxicité ont été évalués. Les valeurs plasmatiques de créatinine et d'urée sont des marqueurs établis de la fonction rénale chez l'homme et l'animal (**Ferguson et al., 2012 , Ferguson et al., 2013**). Tous deux sont des produits métaboliques filtrés librement lors de la filtration glomérulaire du rein de la circulation et leurs taux accrus dans le plasma indiquent une altération de la fonction rénale (**George et al., 2014**). Les données générées dans cette étude suggèrent que le CPM altère la fonction rénale, entraînant une accumulation de ces

biomarqueurs dans le plasma du rat. L'augmentation des teneurs en urée et en créatinine observée dans cette étude est cohérente avec un rapport précédent sur le CPM chez la souris (**Mombeini et al., 2022**). Cependant, les résultats de cette étude ont montré que l'extrait hydro méthanolique de *Centaurium* sp et la vitamine E offrait une protection aux reins contre les lésions causées par le CPM, provoquant une inversion des niveaux d'urée et de créatinine augmentés par le CPM. Nos résultats sont en accord avec les études de **Sefi et al. (2013)** et **Djordjevic et al. (2022)** qui ont montré l'effet néphroprotecteur de *Centaurium erythraea* et *Centaurium umbellatum* respectivement.

# Conclusion

### Conclusion

L'objectif de cette étude est de procéder à une vérification scientifique de l'utilisation traditionnelle de la plante *Centaurium* sp en tant qu'agent hépatoprotecteur. Pour ce faire, nous avons étudié l'activité antioxydant et préventive de de l'extrait hydrométhanolique de *Centaurium* sp vis avis la toxicité hépatique, rénale, et hématologique de la cyclophosphamide *in vivo*. Nous avons évalué également les taux de composés phénoliques présents dans l'extrait et ont à démontrer l'efficacité de l'extrait en tant qu'agent antioxydant *in vitro*.

L'extrait hydrométhanolique de *Centaurium* sp a démontré une efficacité en tant qu'antioxydant (test du DPPH). Cette efficacité est attribuable à la présence de phénols et de flavonoïdes de qualité dans l'extrait. Cependant, sa capacité antioxydante est considérée comme modérée par rapport à la norme standard telle que la vitamine E.

Les résultats biochimiques de cette étude mettent en évidence le potentiel protecteur de l'extrait hydrométhanolique de *Centaurium* sp et la vitamine E contre la toxicité rénale et hépatique induite par le cyclophosphamide chez le rat. Les effets ont été perpétrés par la modulation du stress oxydatif et des dommages histopathologiques observés dans le foie. Ainsi, le prétraitement par l'extrait hydrométhanolique de *Centaurium* sp et la vitamine E a diminué le stress en régulant à la déplétion du GSH et en diminuant le MDA.

Ces résultats soulignent la probabilité que les attributs antioxydants de *Centaurium* sp jouent un rôle central dans ses puissants effets hépatoprotecteurs et néphroprotecteurs.

L'extrait hydrométhanolique de *Centaurium* sp a restauré partiellement les modifications des différents paramètres hématologiques exercés par le cyclophosphamide.

De plus, l'extrait hydrométhanolique de *Centaurium* sp n'était pas toxique par voie orale.

Cette recherche pourrait avoir des implications significatives pour la santé humaine, en particulier dans la gestion des affections hépatiques et rénales et dans le traitement de l'anémie résultant des effets secondaires de cyclophosphamide.

Ces résultats ont confirmé le lien entre l'usage médicinal traditionnel et les résultats des expériences scientifiques biologiques.

*Centaurium* sp pourrait être un candidat potentiel pour un agent complémentaire contre les effets secondaires de la chimiothérapie.

Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour identifier les phytoconstituants précis responsables de ces effets protecteurs hépatorénaux, ouvrant ainsi la voie à une exploration plus complète dans les études futures.

# **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

- Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016; 78(4), 661-671.
- Akyol S, Gulec MA, Erdemli HK, Akyol O. Can propolis and caffeic acid phenethyl ester be promising agents against cyclophosphamide toxicity? *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016; 5(1):105-7. doi: 10.5455/jice.20160127024542.
- Alqahtani S & Mahmoud AM. Gamma-Glutamylcysteine Ethyl Ester Protects against Cyclophosphamide-Induced Liver Injury and Hematologic Alterations via Upregulation of PPAR $\gamma$  and Attenuation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 4016209. doi: 10.1155/2016/4016209.
- Altaylý E, Malkoc E, Alp BF, Korkmaz A. Prevention and treatment of cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. *J Mol Pathophysiol*. 2012; 1: 53-62. doi.org/10.5455/jmp.20120321060902
- Althunibat OY, Abukhalil MH, Jghef MM, Alfwuaires MA, Algefare AI, Alsuwayt B, Alazragi R, Abourehab MAS, Almuqati AF, Karimulla S, Aladaileh SH. Hepatoprotective effect of taxifolin on cyclophosphamide-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice: Involvement of Nrf2/HO-1 signaling. *Biomol Biomed*. 2023; 23(4):649-660. doi: 10.17305/bb.2022.8743.
- ANSM. Cyclophosphamide Sandoz 1000 mg, poudre pour solution injectable ou pour perfusion-Résumé des caractéristiques du produit. 2019. [http://www.agenceprd.anism.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0263087 .htm](http://www.agenceprd.anism.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0263087.htm)
- Ayza M A, Zewdie K A et al. The Role of Antioxidants in Ameliorating Cyclophosphamide Induced Cardiotoxicity, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020; 2020.
- Basu A, Ghosh P, Bhattacharjee A, Patra AR, Bhattacharya S. Prevention of myelosuppression and genotoxicity induced by cisplatin in murine bone marrow cells: effect of an organovanadium compound vanadium (III)-l-cysteine. *Mutagenesis*. 2015; 30(4):509-17. doi: 10.1093/mutage/gev011.
- Baxter. Cyclophosphamide for Injection, USP. 2013. [http://www.baxtermedicationdeliveryproducts.com/pdf/Cyclophosphamide\\_Powder\\_Feb\\_2013\\_HA3001301\\_1.pdf](http://www.baxtermedicationdeliveryproducts.com/pdf/Cyclophosphamide_Powder_Feb_2013_HA3001301_1.pdf).
- Ben Abid F, Gazzah A, Ousbane A et al. Les alkylants. *Oncologie*, 2007; 9(11): 751-757. doi.org/10.1007/s10269-007-0785-z
- Bhattacharjee A, Basu A, Ghosh P, Biswas J, Bhattacharya S. Protective effect of Selenium nanoparticle against cyclophosphamide induced hepatotoxicity and genotoxicity in Swiss albino mice. *J Biomater Appl*. 2014; 29(2):303-317. doi: 10.1177/0885328214523323.

- Boddy AV, Yule SM. Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines Clinical pharmacokinetics 2000; 38(4): 291-304.
- Boone L, Meyer D, Cusick P, Ennulat D, Bolliger AP, Everds N, Meador V, Elliott G, Honor D, Bounous D, Jordan H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. Vet Clin Pathol. 2005; 34(3):182-8. doi: 10.1111/j.1939-165x.2005.tb00041.x.
- Božunović J, Ivanov M, Petrović J, Gašić U, Nakarada Đ, Milutinović M, Aničić N, Giba Z, Mišić D, Stojković D. Solvent System-Guided Extraction of *Centaureum spicatum* (L.) Fritch Provides Optimized Conditions for the Biological and Chemical Characteristics of the Herbal Extracts. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Feb 6;16(2):245. doi: 10.3390/ph16020245. PMID: 37259391; PMCID: PMC9967942.
- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. J Nat Prod. 2001; 64(7):892-5. doi: 10.1021/np0100845.
- Caglayan C, Temel Y, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S. Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. Environ Sci Pollut Res Int. 2018; 25(21): 20968-20984. doi: 10.1007/s11356-018-2242-5.
- Carmagnac S, Chanoinat S, Henry F. et al. Fiche pratique sur l'alopecie du reseau 78 espace santé-cancer Rhône-Alpes. 2015. <https://ressourcesaura.fr/wpcontent/uploads/2018/11/BPAFPI1503ALOPECIE.pdf>
- Catalano E. Role of phytochemicals in the chemoprevention of tumors. 2016; arXiv preprint arXiv:1605.04519.
- Cengiz M, Cetik Yildiz S, Demir C, Şahin İK, Teksoy Ö, Ayhanci A. Hepato-preventive and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide. J Trace Elem Med Biol. 2019 May;53:1-7. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.01.013.
- Chabane S. Mémoire de Magister Etude phytochimique de la plante erythraea centaureum (L.) pers de la région de Msila étude de quelques activités biologiques de l'espèce étudiée. 2017. université de Blida.
- Chang, M.S., Kim, do R., Ko, E.B., Choi, B.J., Park, S.Y., Kang, S.A. and Park, S.K. (2009). Treatment with Astragali radix and Angelicae radix enhances erythropoietin gene expression in the cyclophosphamide-induced anemic rat. J Med Food, 12: 637–642.
- Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, Calina D, Sharifi-Rad J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. Front Chem. 2023 May 10;11:1158198. doi: 10.3389/fchem.2023.1158198. PMID: 37234200; PMCID: PMC10206224.

- De Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44(11):1135-64. doi: 10.2165/00003088-200544110-00003.
- Devi HP, Mazumder PB. Methanolic extract of *Curcuma caesia* Roxb. prevents the toxicity caused by cyclophosphamide to bone marrow cells, liver and kidney of mice. *Pharmacogn Res.* 2016; 8(1): 43–49.
- Đorđević MM, Tolić A, , Rajić J, Mihailović M, Arambašić Jovanović J, Uskoković A, et al. *Centaurium erythraea* methanol extract improves the functionality of diabetic liver and kidney by mitigating hyperglycemia-induced oxidative stress. *J Funct Foods.*2022; 90:104975. doi: 10.1016/j.jff.2022.104975.
- Ekhart C, Doodeman VD, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18(6):515-23. doi: 10.1097/FPC.0b013e3282fc9766.
- El Menyiy N, Guaouguaou FE, El Baaboua A, El Omari N, Taha D, Salhi N, Shariati MA, Aanniz T, Benali T, Zengin G, El-Shazly M, Chamkhi I, Bouyahya A. Phytochemical properties, biological activities and medicinal use of *Centaurium erythraea* Rafn. *J Ethnopharmacol.* 2021 Aug 10;276:114171. doi: 10.1016/j.jep.2021.114171.
- El-Beheiry KM, El-Sayed El-Sayad M et al. Combination of metformin and hesperidin mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. Emerging role of PPAR- $\gamma$ /Nrf-2/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2023; 117:109891. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.109891.
- El-Emam SZ. Sesamol alleviates the cytotoxic effect of cyclophosphamide on normal human lung wi-38 cells via suppressing rage/nf- $\kappa$ b/autophagy signaling. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2021; 11, 333-344. doi.org/10.1007/s13659-020-00286-6.
- El-Kashef DH, Rahim MA. Levocetirizine attenuates cyclophosphamide-induced lung injury through inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and MMP-9. *BMC Pharmacol Toxicol .* 2023; 24, 76 : 1-10 . <https://doi.org/10.1186/s40360-023-00717-3>
- Ellman, G.L. Plasma Antioxidants. *Arch Biochem Biophys.*, 1959, 82, 70-77.
- El-Menyiy N, Guaouguaou FE, El Baaboua A, El Omari N, Taha D, Salhi N, Shariati MA, Aanniz T, Benali T, Zengin G, El-Shazly M, Chamkhi I, Bouyahya A.. Phytochemical properties, biological activities and medicinal use of *Centaurium erythraea* Rafn. *J Ethnopharmacol.* 2021; 10276: 114171. doi: 10.1016/j.jep.2021.114171.
- El-Naggar, S. A., Alm-Eldeen, A. A., Germoush, M. O., El-Boray, K. F., & Elgebaly, H. A. (2015). Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*,53(2), 235-241.

Emadi, A., Jones, R. & Brodsky, R. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 638–647 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>

Eviq. Non-Hodgkin lymphoma CHOP21 (CYCLOPHOSPHamide DOXOrubicin vinCRISTine prednisolone). 2019. <https://www.eviq.org.au/haematologyandbmt/lymphoma/nonhodgkinlymphoma/69-chop21-cyclophosphamidedoxorubicinvincristin#interactions>.

Fatema F , Nahar S, Akhter QS. Cyclophosphamide induced anemia in Wistar rats: can it be prevented by Sajna (*Moringaoleifera*)? *J Bangladesh Soc Physiol* 2020;15(1): 11-16.

Ferguson MA, Waikar SS. Established and emerging markers of kidney function. *Clin Chem* 2012; 58(4): 680–689.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05015-1.

Garai, O. Nitrogen mustard. *Postgrad Med J* 1948; 24(272): 307-11.

George GS, Wakasi ME, Egoro E. Creatinine and urea levels as critical markers in end-stage renal failure. *Res Rev J Med Health Sci.* 2014; 3:41–44.

Ghobadi E, Moloudizargari M, Asghari MH, Abdollahi M. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2017; 13(5): 525-536, doi: 10.1080/17425255.2017.1277205.

Groopman, J.E. and Utri, L.M. (1999). Chemotherapy-induced anemia in adults: Incidence and treatment. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91:1616-1634

HAS. Avis de la commission de la Transparence sur le cyclophosphamide. 2016. [https://www.hassante.fr/upload/docs/evamed/CT15108\\_ENDOXAN\\_PIS\\_RI\\_Avis1\\_CT15108&9245.pdf](https://www.hassante.fr/upload/docs/evamed/CT15108_ENDOXAN_PIS_RI_Avis1_CT15108&9245.pdf).

Hasan HF, Abdel-Hamid GR, Ebrahim SI. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Diallyl Disulfide on Hepatotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. *Natural Product Communications.* 2020; 15(10). doi:10.1177/1934578X20969083.

Holly, W.S., Colleen, J.W., Kristen, K.S., Bartley, W.H. and Daniel, W. (2003): A predictive F344 rat immune toxicology model: cellular parameters combined with humoral response to NP-CyG and KLH. *Toxicology*, 194(1-2): 129-145.[

INESSS. Guide pour la prévention et le traitement des nausées et vomissements induits par la chimiothérapie ou la radiothérapie chez l'adulte. m2019. <https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Rapports/Oncologie/INESSSAntiemetiques.pdf>.

Iqbal A, Iqbal MK, Sharma S, Ansari MA, Najmi AK, Ali SM, Ali J, Haque SE. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci.* 2019; 218: 112-131. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.018.

Iqbal A, Iqbal MK, Sharma S, Ansari MA, Najmi AK, Ali SM, Ali J, Haque SE. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci.* 2019 Feb 1;218:112-131. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.018. 30552952.

Iqbal A, Syed MA, Haque MM, Najmi AK, Ali J, Haque SE. Effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced bone marrow and hematologic toxicity in Swiss albino mice. *Exp Hematol.* 2020 Feb;82:24-32. doi: 10.1016/j.exphem.2020.01.007.

Kabbat M. Prévalence et facteurs associés des nausées et vomissements chimioinduits : Étude prospective à l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès (À propos de 70 cas). 2017. [http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e\\_theses/207-17.pdf](http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e_theses/207-17.pdf).

Korkmaz A, Topal, Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol* 2007; 23: 303–312.

Kotoh K, Kato M, Kohjima M, Tanaka M, Miyazaki M, Nakamura K, Enjoji M, Nakamuta M, Takayanagi R. Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure. *Exp Ther Med.* 2011; 2(2):195-199. doi: 10.3892/etm.2011.197.

Kuzu M, Yıldırım S, Kandemir FM, Küçükler S, Çağlayan C, Türk E, Dörtbudak MB. Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats. *Chem Biol Interact.* 2019; 308:89-100. doi: 10.1016/j.cbi.2019.05.017.

Latha, P.G. and Panikkar, K.R. (1999): Modulatory effects of *Ixora coccinea* flower on cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Phytother. Res.*, 13: 517–52.

Lenglet G. Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines. *Médecine humaine et pathologie.* Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. NNT : 2010LIL2S048.

Liu, M., Tan, H., Zhang, X., Liu, Z., Cheng, Y., Wang, D., & Wang, F. (2014). Hematopoietic effects and mechanisms of Fufang E'jiao Jiang on radiotherapy and chemotherapy-induced myelosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3), 575-584

Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S. Activités anti-radicalaires d'extraits de Jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal.*2006; (1):3-8

Mahipal P, Pawar RS. Nephroprotective effect of *Murraya koenigii* on cyclophosphamide induced nephrotoxicity in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2017; 10(8): 808-812.

- Mahmoud M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR $\gamma$  and abrogation of oxidative stress and inflammation. 2014. Beni-Suef University. P: 63.
- Manda K, Bhatia AL. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell Biol Toxicol.* 2003;19(6): 367-372.
- Maor Y, Malnick S. Liver injury induced by anticancer chemotherapy and radiation therapy. *Int J Hepatol.* 2013; 2013: 8151.
- Matalon ST, Ornoy A, Lishner M. Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta). *Reprod Toxicol.* 2004; 18(2):219-30. doi: 10.1016/j.reprotox.2003.10.014.
- Mecheri A, Hammoud L et al. In Vitro Antioxidant Activity of *Asteriscus Graveolens* (Forsk.) and Its Protective Effect on Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity and Testicular Oxidative Damage in Rats. *Pharm Chem.* 2024; J 57, 1956–1966. <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03102-4>.
- Merghem M, Dahamna S. Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Extracts. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics.* 2020; 10(2): 171-174.
- Moghe A, Ghare S, Lamoreau B, Mohammad M, Barve S, McClain C, Joshi-Barve S. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. *Toxicol Sci.* 2015; 143(2):242-55. doi: 10.1093/toxsci/kfu233.
- Mohammed MJ, Tadros MG, Michel HE. Geraniol protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats: Possible role of MAPK and PPAR- $\gamma$  signaling pathways. *Food Chem Toxicol.* 2020; 139:111251. doi: 10.1016/j.fct.2020.111251.
- Mombeini MA, Kalantar H, Sadeghi E, Goudarzi M, Khalili H, Kalantar M. Protective effects of berberine as a natural antioxidant and anti-inflammatory agent against nephrotoxicity induced by cyclophosphamide in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2022; 395(2):187-194. doi: 10.1007/s00210-021-02182-3.
- Moore MJ. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical pharmacokinetics.* 1992; 20(3): 194-208.
- Motawi TM, Sadik NA, Refaat A. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(8-9):2326-36. doi: 10.1016/j.fct.2010.05.067.
- Mroueh M, Saab Y, Rizkallah R. Hepatoprotective activity of *Centaurium erythraea* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* 2004; 18(5):431-3. doi: 10.1002/ptr.1498.

Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(6):793-802. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.009..

Okafor A I., Ranferon-12 Tonic Mitigates Haematological Abnormalities in Cyclophosphamide-treated Rats. *NJBMB* (2024) 39(1):16-21 DOI: <https://doi.org/10.4314/njbmb.v39i1.3>

Ola OS, Odunola OA. *Eulophia gracilis* pseudobulb extract mitigates cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress on murine hepatic tissue. *J.Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci.* 2023; 9: 426–435. doi.org/10.1007/s43994-023-00050-9.

Ola, O.S., Odunola, O.A. *Eulophia gracilis* pseudobulb extract mitigates cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress on murine hepatic tissue. *J.Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci.* 9, 426–435 (2023). <https://doi.org/10.1007/s43994-023-00050-9>

OncoLogiK. NVIC-Patient. Aout 2015. <http://oncologik.fr/referentiels/afsos/nvci-patient>.

Patel JM. Metabolism and pulmonary toxicity of cyclophosphamide. *Pharmacol Ther.* 1990; 47(1): 137-46. doi: 10.1016/0163-7258(90)90049-8.

Patra K, Bose S, Sarkar S et al. Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. *Chem Biol Interact.* 2012; 195: 231-239

Patti F, Lo Fermo S. Lights and shadow of cyclophosphamide in the treatment of multiple sclerosis. *Autoimmune Dis.* 2011; 2011: 961702.

Prša P, Karademir B, Biçim G, Mahmoud H, Dahan I, Yalçın AS, Mahajna J, Milisav I. The potential use of natural products to negate hepatic, renal and neuronal toxicity induced by cancer therapeutics. *Biochem Pharmacol.* 2020; 173:113551. doi: 10.1016/j.bcp.2019.06.007.

Qiu R, Kalthorn, TF. ABCC2-mediated biliary transport of 4- glutathionylcyclophosphamide and its contribution to elimination of 4- hydroxycyclophosphamide in rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2004; 308: 1204-1212.

Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45:1551–1557.

Rossi SE, Erasmus JJ, McAdams HP, Sporn TA, Goodman PC. Pulmonary drug toxicity: radiologic and pathologic manifestations. *Radiographics.* 2000; 20(5):1245-59. doi: 10.1148/radiographics.20.5.g00se081245.

Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int.* 2007; 7:9. doi: 10.1186/1475-2867-7-9.

Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suryaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8(1):15-9. doi: 10.1016/0891-5849(90)90139-a.

- Sefi M, Troudi A, Boudawara T, Zeghal N. Centaurium umbellatum attenuates nephrotoxicity induced by streptozotocin in adult rats. *RRBS*. 2013; 7(2): 58-65.
- Sherif IO. The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway. *Int Immunopharmacol*. 2018; 61:29-36. doi: 10.1016/j.intimp.2018.05.007.
- Shokrzadeh M, Chabra A, Naghshvar F, Ahmadi A, Jafarnejhad M, Hasani-Nourian Y. Protective Effects of Melatonin against Cyclophosphamide-induced Oxidative Lung Toxicity in Mice. *Drug Res (Stuttg)*. 2015; 65(6):281-6. doi: 10.1055/s-0034-1371801.
- Šiler B, Mišić D. Biologically Active Compounds from the Genus Centaurium s.l. (Gentianaceae). *Studies in Natural Products Chemistry*, 2016; 363–397. doi:10.1016/b978-0-444-63601-0.00011-9.
- Simsek A, Tugcu V, Tasci AI. New biomarkers for the quick detection of acute kidney injury. *ISRN Nephrol*. 2012; 2013:394582. doi: 10.5402/2013/394582.
- Singh M, Kumar N, Shuaib M, Garg VK, Sharma A. A review on renal protective agents for cyclophosphamide induced nephrotoxicity. *World J Pharm Pharmaceut Sci*. 2014; 3: 737-747.
- Singhurst JR, Keesling J, Holmes WC. Centaurium tenuiflorum (Gentianaceae) new to Arkansas. *Phytoneuron*. 2015; 55:1-2.
- Singleton V L & Rossi J A J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult* 16: 144-58.
- 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
- Sladek NE. Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Current pharmaceutical design*. 2015; 5: 607-626.
- Tahraoui A, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of Centaurium erythraea in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2010; 132(1):48-55. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.038.
- Temel Y, Kucukler S, Yıldırım S, Caglayan C, Kandemir FM. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020; 393(3):325-337. doi: 10.1007/s00210-019-01741-z.
- Tobyn G, Denham A, Whitelegg M. Centaurium erythraea, centaury. In *The Western Herbal Tradition: 2000 Years of Medicinal Plant Knowledge*. Elsevier. 2010;135-144. doi: 10.1016/B978-0-443-10344-5.00018-5.

- Todorovic S, Giba Z, Simonović A, Božić D, Banjanac T, Grubišić D. Manganese effects on in vitro development of lesser centaury [*Centaurea pulchella* (Sw.) Druce]. *Arch. Biol. Sci.* 2009; 61(2): 279-283. doi.org/10.2298/ABS0902279T.
- Touati W. Sensibilisation de cellules tumorales au cyclophosphamide par transfert de gène: de l'in vitro à l'in vivo. Thèse de doctorat. Université René Descartes-Paris. 2013 p :50.
- Trifunović-Momčilov M, Krstić-Milošević D, Trifunović S, Podolski-Renić A, Pešić M, Subotić A. (2016). Secondary Metabolite Profile of Transgenic Centaury (*Centaurea erythraea* Rafn.) Plants, Potential Producers of Anticancer Compounds. In: Jha, S. (eds) *Transgenesis and Secondary Metabolism. Reference Series in Phytochemistry.* Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-27490-4\_5-2
- Turedi S. Protective/preventive effects of quercetin against cyclophosphamide-induced hepatic inflammation, apoptosis and fibrosis in rats. *Hepatol Forum.* 2023; 4(3):135-141. doi: 10.14744/hf.2023.2023.0026.
- Uchiyama, M.; and Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.*, 1978, 86, 271-278. doi.org/10.1016/0003-2697(78)90
- Wang, H., Dong, Gao X., Zhou GC. In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem*, 2008; 106: 888-895.
- Waymel J. Un plan de conservation pour la petite Centaurée vivace (*Centaurea portense* (Brot.) Butcher) en Basse-Normandie. *E.R.I.C.A.*, 2016; 30 : 59-67.
- Wright RO, Magnani B, Shannon MW, Woolf AD. N-acetylcysteine reduces methemoglobin in vitro. *Ann Emerg Med.* 1996; 28(5):499-503. doi: 10.1016/s0196-0644(96)70112-9.
- Yang B, Zheng J, Kallio H. Influence of origin, harvesting time and weather conditions on content of inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Food Chemistry.* 2011; 125(2): 388-396.
- Yilmaz E, Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. The therapeutic effects of curcumin and capsaicin against cyclophosphamide side effects on the uterus in rats. *Acta Cir Bras.* 2018; 33(6):499-507. doi: 10.1590/s0102-865020180060000004.
- Zhai X, Zhang Z, Liu W, Liu B, Zhang R, Wang W, Zheng W, Xu F, Wang J, Chen Y. Protective effect of ALDH2 against cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity via attenuating oxidative stress and reactive aldehydes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 499(1):93-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.041.
- Zhang J, Tian Q, Zhou S-F. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Current Drug Therapy.* 2006; 1: 55-84. doi: 10.2174/157488506775268515

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : AYACHI Souad  
ADACI Issam

## Effet antioxydant et protecteur de *Centaurium sp* vis-à-vis la toxicité du cyclophosphamide

### Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Toxicologie

#### Résumé

*Centaurium sp* (*Gentianaceae*) est une plante médicinale utilisée en Algérie pour traiter le diabète, la douleur, la fièvre, l'inflammation et les maladies gastro-intestinales. Le cyclophosphamide (CPM) est un médicament antinéoplasique utilisé pour traiter de nombreux types de cancers ; malheureusement, son activité antitumorale associe des effets toxiques sur plusieurs organes dont le sang, les reins et le foie. Le mécanisme approprié de sa toxicité est associé à l'induction du stress oxydatif. Cette étude vise à déterminer l'effet protecteur de la vitamine E ou de l'extrait hydrométhanolique de la plante *Centaurium sp* contre les effets hématotoxiques, néphrotoxiques et hépatotoxiques induits par le CPM.

Notre étude expérimentale a été réalisée sur 25 rats mâles répartis en cinq groupes pendant 07 jours : Groupe 1 témoin. Groupe 2 traités par l'extrait de la plante *Centaurium sp* uniquement (300 mg/kg de poids corporel) par gavage pendant 06 jours. Groupe 3 traités par le CPM en dose unique (200 mg/kg de poids corporel) par injection intrapéritonéale le quatrième jour de l'expérience. Groupe 4 et 5 traité par la vitamine E (300 mg/kg de poids corporel) ou l'extrait de la plante *Centaurium sp* (300 mg/kg de poids corporel) par gavage pendant 06 jours avec injection du cyclophosphamide le quatrième jour.

Les résultats obtenus montrent que l'administration du CPM a provoqué un effet hématotoxique (anémie), hépatotoxique (augmentation de l'activité enzymatique des transaminases ALAT, ASAT, LDH et PAL), et néphrotoxique (augmentation des taux sériques de la créatinine et de l'urée). Le CPM a un effet globalement pro-oxydant, ceci est révélé par l'augmentation du taux de MDA (indice de la peroxydation lipidique) et la diminution du taux de glutathions réduit (GSH) dans les tissus hépatiques. En plus l'examen des coupes histologiques a montré une perte sévère de l'architecture hépatique.

Nos résultats montrent aussi, que la supplémentation en vitamine E ou en extrait de la plante *Centaurium sp* aux rats traités par le CPM a améliorée les perturbations des paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologiques et le statut oxydant/antioxydant et par conséquent atténuer l'intensité de la toxicité induite par le CPM. Les résultats de l'évaluation *in vitro* de l'effet piègeur des radicaux DPPH ont montré le pouvoir antioxydant de *Centaurium sp*. Ces résultats sont fortement corrélés avec les teneurs en phénols et flavonoïdes totaux.

**Mots-clefs :** Cyclophosphamide ; Stress oxydant ; Hépatotoxicité ; Hématotoxicité ; Vitamine E ; *Centaurium sp* ; Antioxydant.

**Laboratoires de recherche :** laboratoire VARENBIOMOL (U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Président du jury :** Dr BOUBEKRI Nassima (MC(A) - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Pr AMRANI Amel (PROF - UFM Constantine 1).

**Examineur(s) :** Dr KABOUCHE Sami (MC(A) - UFM Constantine 1),