



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : **Biologie Animale.** قسم : **بيولوجيا الحيوان**

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Toxicologie*

Intitulé :

**L'effet préventif de la plante médicinale Algérienne
Salvia Officinalis contre la toxicité cardiaque induite par
la Doxorubicine**

Présenté et soutenu par :

Le : 01 /07/2017

Bouaouina Dalila

Boulhabel Hala Roumeissa

Bousba Esma

Jury d'évaluation :

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

Rapporteur : Mme Ihoual Safia (MA- UFM Constantine).

Examineurs : Mme Boubekri Nassima (MC- UFM Constantine).

Mme Mouri Fouzia (MA- UFM Constantine).

Année universitaire
2016- 2017

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur **Mme Ihoual. S** maître assistante à l'université Mentouri de Constantine à la faculté de sciences de la nature et de la vie pour sa simplicité, son attention, sa prudence et sa générosité scientifique

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury **Mr. Lalaoui. K, Mme Boubekri.N, Mme Mouri.F** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

Notre remerciement s'adressent aussi à tout le personnel du département de Biologie animale de l'Université de Frères Mentouri Constantine,

Sans oublier l'aide de ses personnes : **Mme Necib .S** maître de conférences, **Mr Medassi.I, Mr Messaoudi. S, Mr Boulkandoul. R** maître assistant à l'université Mentouri de Constantine à la faculté des sciences de la nature et de la vie; **Mr yakhlaf. Y.**

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

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

Je décide ce travail à :

*A mes chers parents mon père **Hocine** et ma mère **Louiza** qui sont la source éternelle de
mon bonheur,*

Qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour

Et d'affection.

Que Dieu les gardes en bonne santé toujours.

*A mes chères sœurs **Assia** et **Maroua** pour leur*

Aide et leur soutien moral

*A mes frères adorés **Faress**, **Adel** et **Amine** pour leur compréhension*

*A mes partenaires **Hala** et **Esma***

*A mes chérés amies **Fatima Zohra** et **Souheila***

A toute ma famille, mes amies, et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation.

Dalila



Dédicace

Je dédie ce mémoire à ...

À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre

À cette source de tendresse, de patience et de générosité

À ma mère et mon père

À qui me conseillait et me poussait vers le but le plus sublime dans la vie

A mes chers sœurs Hadjer et Amina

A mon cher frère Abd El Raouf

A tous mes chers amis

Amina, souheila, Fatima .D, Wissem, Fatima .L

À mes chers partenaires Hala et Dalila

A tous mes collègues de promotion juin 2017

A tous ceux que j'aime

A tous un grand Merci

Esma



Dédicace

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

A la mémoire de ma grand-mère

A Imed ; Ouail bibichou

A mes sœurs : jojo , Batoul , Meriem , Amina.

A mon oncle Kamel et ma tante Fatiha.

A mes cousines.

A mes partenaires Dalila et Esma

A mes amies : sousou , Fatima , Chahra, wissem.

Hala.R

SOMMAIRE

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

	pages
Introduction	1
Partie I : synthèse bibliographique	
I. Le cœur	3
I.1. Définition et structure du cœur	3
I.2. Les tuniques cardiaques.....	4
I.3. Pathologies cardiaques.....	6
II. La Doxorubicine.....	7
II.1. Généralité	7
II.2. Définition de la doxorubicine	7
II.3. Structure moléculaire.....	8
II.4. Les raisons d'utiliser ce médicament.....	8
II.5. La pharmacocinétique de la Doxorubicine	8
II.5.1. L'absorption et distribution.....	8
II.5.2. Métabolisme hépatique.....	9
II.5.3. L'élimination.....	10
II.6. Mode d'action.....	10
II.6.1. L'interaction avec les bases azotées de l'ADN.....	10
II.6.2. Inhibition de l'enzyme topo-isomérase II.....	11
II.6.3. Inhibition de l'enzyme hélicase.....	11
II.6.4. Production des radicaux libres.....	11
II.6.5. Transport nucléaire.....	11
II.6.6. L'apoptose.....	11
III. La cardiotoxicité	12
III.1. La cardiotoxicité aiguë et subaiguë	12
III.2. Toxicité chronique.....	12

III.3. Aspects biochimiques de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	12
III.3.1. Inhibition de la topoisomérase II.....	13
III.3.2. Induction d'un stress oxydant.....	14
III.3.3. Apoptose.....	16
III.4. Hypothèse des métabolites toxiques issus du métabolisme de la doxorubicine.....	17
III.5. Aspects histologiques des lésions cardiaques induites par les anthracyclines	17
III.6. Les biomarqueurs.....	17
III.6.1. CPK	17
III.6.2. LDH	18
III.6.3. Les Aminotransférases	19
III.7. Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	20
III.7.1. Diminution de la dose cumulée totale de la doxorubicine.....	21
IV. Salvia officinalis	22
IV.1. Définition	22
IV.2. Description morphologique.....	22
IV.3. Répartition géographique	23
IV.4. Classification taxonomique.....	24
IV.5. Les principaux constituants.....	24
IV.6. Utilisation traditionnelle	25
IV.7. Toxicité.....	25
V. Le stress oxydatif	26
V.1. Les radicaux libres.....	26
V.2. Les antioxydants.....	26
V.3. Mécanismes d'action des antioxydants.....	27
V.3.1. Antioxydants enzymatiques	27
V.3.2. Antioxydants non enzymatiques.....	27
a) Acide ascorbique (vitamine C)	27
b) Tocophérols (dont la vitamine E)	28
c) Polyphénols.....	28
d) Les flavonoïdes.....	28

e) Les tanins	29
f) Alcaloïdes.....	29
g) Les saponosides.....	29
Partie II : Matériels et Méthodes	
I. Matériel.....	30
I.1. Matériel biologique(Echantillonnage)	30
I.1.1. Matériel végétal : « <i>Salvia officinalis</i> »	30
I.1.2. Le médicament anticancéreux : la doxorubicine.....	30
I.2.Réactifs chimiques et instrumentations.....	30
I.3. Les appareils utilisés.....	30
I.4. Matériel animal.....	31
I.4.1.Etude expérimentale.....	31
II. Méthodes.....	31
II. 1 .Screening phytochimique de l'extrait végétale	31
II.1.1. Mise en évidence des tanins.....	31
II.1.2. Mise en évidence des saponosides.....	31
II.1.3. Mise en évidence des composés réducteurs.....	32
II.1.4. Mise en évidence des alcaloïdes.....	32
II.2. Peroxydation des lipides.....	32
II.3. Activité anti-oxydante.....	33
II.3.1.Piégeage du radical hydroxyle.....	33
II.3.2. DPPH (effet scavenger)	34
II.3.3. Reducing power.....	35
II.4. Traitement des animaux.....	35
II.5.Les groupes des animaux.....	35
II.5.1. sacrifice des animaux et prélèvement d'échantillons biologiques.....	36
II.6.Préparation de la fraction cytosolique de tissus	36
II.6.1.Evaluation du MDA et du GSH cardiaque.....	36
II.6.2. Dosage du glutathion réduit cardiaque.....	37
II.6.3. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique.....	38

II.7. Dosage des paramètres biochimiques.....	39
II.8.Préparation des échantillons des coupes histologiques.....	39
II.8.1.L'analyse histologique.....	40
II.9. Evaluation statistique.....	41
Résultats et Discussion.....	42
Conclusion.....	60
Résumé	
Références bibliographique	

Abréviations

%	Pourcentage.
A	Absorption.
ADP	Adenosine diphosphate.
ALAT	Alanine amino transférase.
AST	Aspartate transaminase.
ATP	Adenosine triphosphate
Bax	Bcl (B cell lymphoma).
Bcl-XL	B cell lymphoma-extra large
BHT	Butylhydroxytoluene.
BSA	Albumine bovine serum.
CAT	Catalase.
CHUC	Centre Hospitalo_Universitaire Ben Badis de Constantine.
IC50	Concentration inhibitrice 50%.
CPK	Créatinine Phosphokinase.
Cs	Capillaires sanguins.
DNA	Desoxyribonucleic acid.
DOXO	Doxorubicine.
DPPH°	1, 1-diphenyl-2- dipicrylhydrazyl.
Ds	Dystrophie musculaire.
EBSO	Extrait butanolique de salvia officinalis.
ECG	Electrocardiographie.
FMCi	Fibre musculaire cardiaque intacte.
G	Gramme.
G-6-PDH	Glucose-6-phosphate deshydrogenase.
GSH	Glutathione.

GSSH	Glutathione oxydé.
H&E	Hématoxyline et éosine.
H2O2	Peroxyde d'hydrogene.
HK	Hexokinase.
kg	Kilogramme
LDH	Lactate déshydrogénase.
LFMC	Lyse des fibres musculaires cardiaque.
LO°	Alkoxy radical.
LOO°	Peroxy radical.
LOOH	Organic Hydroperoxide.
MDA	Malondialdehyde.
N	Noyau de cardiomyocyte.
NADH	Reduced nicotinamide dinucleotide.
NADPH	Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate.
O2 -	l'anion superoxyde.
RL	Radicaux libres.
ROS	Reactive oxygen species.
SOD	Superoxyde dismutase.
TBA	Thiobarbituric acid.
Tc	Tissu conjonctif.
TCA	Trichloroacetic acid.
TGO	Glutamic-oxaloacetic transaminase.
UV	Ultra-violet.
Vit C	Vitamine C.
Vit C°	Vitamine C radicalaire.

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Représentation schématique du cœur.....	3
Figure 2 : Les tuniques cardiaques	5
Figure 3 : La structure chimique de la doxorubicine.....	8
Figure 4 : Métabolisme hépatique de la doxorubicine.....	9
Figure 5 : Mécanismes de cardiotoxicité induite par la doxorubicine.....	11
Figure 6 : Mécanisme d'action de la topoisomérase II.....	13
Figure 7 : Production des radicaux libres par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines.....	15
Figure 8 : Théorie de métabolites toxiques des anthracyclines.....	16
Figure 9 : Stratégies pour prévenir la cardiotoxicité induite par l'administration d'anthracyclines.....	20
Figure 10 : La plante de <i>Salvia Officinalis L</i> (sauge)	22
Figure 11 : Répartition géographique du genre <i>Salvia</i> dans le monde.....	23
Figure 12 : Modèle d'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants.....	26
Figure 13 : Les cycles réactionnels de régénération des antioxydants.....	28
Figure 14 : L'activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	28
Figure 15 : Réduction du radical DPPH.....	34
Figure 16 : La formule chimique de la glutathion réduite.....	38
Figure 17 : Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait butanolique de <i>Salvia Officinalis</i>	43
Figure 18 : Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait butanolique de <i>Salvia Officinalis</i>	43
Figure 19 : Piégeage du radical hydroxyle de extrait butanolique de <i>Salvia Officinalis</i> (EBSO) et Vc.....	44
Figure 20 : La concentration inhibitrice 50% de l'extrait butanolique <i>Salvia Officinalis</i> et de BHT qui inhibent 50% du radical DPPH.....	45
Figure 21 : Pouvoir réducteur de l'EBSO et VC.....	46
Figure 22 : Effet de l'extrait butanolique de la plante <i>Salvia Officinalis</i> sur le niveau du MDA dans le cœur.....	47
Figure 23 : Effet de l'extrait butanolique de la plante <i>Salvia Officinalis</i> sur le niveau	

	de GSH dans le cœur.....	48
Figure 24 :	Effet de l'extrait butanolique de la plante <i>salvia officinalis</i> sur le niveau de CAT dans le cœur.....	49
Figure 25 :	Effet de l'extrait butanolique de la plante <i>salvia officinalis</i> sur le niveau du CPK dans le cœur.....	50
Figure26 :	Effet de l'extrait butanolique de la plante du <i>salvia officinalis</i> sur le niveau de LDH dans le cœur.....	51
Figure 27 :	Effet de la Doxorubicine et l'extrait butanolique de la plante <i>Salvia Officinalis</i> sur la fonction du cœur et sa libération d'ALAT et d'ASAT..	52
Figure 28 :	Coupes longitudinales du myocarde du groupe Témoin.....	54
Figure 29 :	Coupes longitudinales du myocarde du groupe traité par la doxorubicine..	54
Figure 30 :	Coupes longitudinales du myocarde du groupe traité par l'extrait butanolique de <i>Salvia Officinalis</i>	55
Figure 31 :	Coupes longitudinales du myocarde du groupe Préventif (DOXO + EBSO)	55

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Classification de la plante.....	24
Tableau 2 :	Analyse Phytochimiques préliminaire d'extrait butanolique de <i>Salvia Officinalis</i>	42

Introduction

Introduction

La doxorubicine est le membre le plus connu et le plus utilisé du groupe des Anthracycline.

C'est le plus commun des médicaments utilisés pour le traitement des tumeurs hématologiques et solides. [1] mais son utilisation clinique est limitée par le développement de cardiomyopathies et d'insuffisances cardiaques congestives. [2,3]

La cardiotoxicité aiguë et chronique présente cependant Une complication importante de cette thérapie [4,5], des effets aigus peuvent se produire immédiatement après le traitement, Son efficacité antitumorale est dose dépendante.

La doxorubicine est un antibiotique cytotoxique anthracyclinique. Elle exerce ses effets anticancéreux et toxiques selon plusieurs mécanismes dont l'intercalation à l'ADN, l'inhibition de la topoisomérase II et la formation de radicaux libres. Ces mécanismes induisent différentes réponses cellulaires et moléculaires dans la mesure où la toxicité de la doxorubicine peut atteindre aussi bien les cellules tumorales que les cellules cardiaques.

En effet, la sensibilité particulière du cœur aux anthracyclines serait liée à un déficit relatif aux défenses anti-oxydantes des myocytes cardiaques par comparaison à d'autres tissus, ce que traduisent un taux relativement bas de superoxyde dismutase et de catalase et un faible taux de renouvellement du glutathion [6].

Les antioxydants font aujourd'hui l'objet de nombreuses études afin d'apporter des solutions au stress oxydant et constituent aussi un grand intérêt dans de nombreux domaines agroalimentaire et pharmaceutique. Ils peuvent neutraliser les radicaux libres qui causent un dommage oxydatif au niveau des molécules biologiques de notre organisme.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités à la fois antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet de certains antioxydants sur quelques paramètres du stress oxydant et les dommages qu'il peut provoquer au niveau du cœur pendant le traitement par la doxorubicine. Nous avons utilisé comme source d'antioxydants, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies, c'est le *Salvia Officinalis*, une plante d'origine méditerranéenne de la famille des labiées répandue en Algérie, Cette plante n'a été jamais étudiée en Algérie sur la toxicité cardiaque du doxorubicine, raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- Des tests préliminaires concernant son activité antioxydante in vitro.
- Etudes de son activité antioxydante in vivo en utilisant un modèle animal traité par la doxorubicine
- Evaluation des différents paramètres biochimiques concernant le stress oxydant
- Une étude histologique sur le cœur pour mettre en évidence d'une part l'effet du stress oxydant associé au doxorubicine et d'une autre part l'efficacité de la plante utilisée comme source d'antioxydants contre les dommages du stress oxydant.

Partie I:

Synthèse bibliographique

I .Le cœur

I.1. Définition et structure du cœur

Le cœur est un organe musculaire creux dont la fonction de pompe permet la circulation du sang dans tout l'organisme.

Le cœur est constitué d'une paroi comportant trois couches tissulaires :

Le péricarde, le myocarde et l'endocarde.

Le cœur est divisé en deux parties : le cœur droit et le cœur gauche séparés par le septum cardiaque. Chaque partie comprend une oreillette et un ventricule [7].

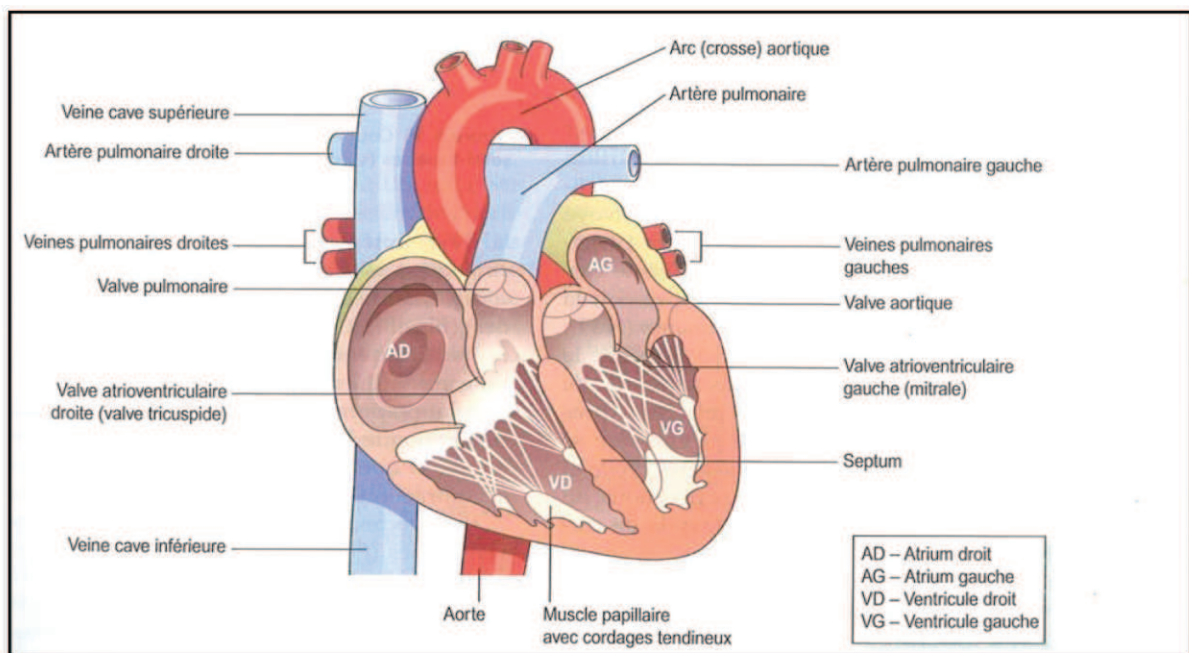


Figure 01 : Représentation schématique du cœur [7]

Le cœur est constitué de plusieurs cavités dont les ventricules droit et gauche ainsi que les oreillettes droite et gauche. Le cœur gauche permet d'irriguer l'ensemble de l'organisme via la circulation pulmonaire. Le cœur droit reçoit le sang provenant de la circulation générale par les veines caves supérieure et inférieure et l'éjecte dans les poumons via l'artère pulmonaire afin qu'il soit réoxygéné [7].

I.2. Les tuniques cardiaques

Les parois cardiaques comportent trois couches distinctes :

- **Le Myocarde**

Le myocarde forme l'essentiel de la masse du cœur ; c'est le muscle du cœur. Il se situe entre l'épicarde et l'endocarde au niveau de la paroi externe du cœur et entre deux zones d'endocarde au niveau des cloisons interauriculaire et interventriculaire.

Le myocarde est constitué de cardiomyocytes, cellules musculaires contractiles organisées en faisceaux circulaires ou spiralés, entre lesquelles des fibres de collagène, des fibres élastiques et des adipocytes forment une charpente conjonctive en continuité avec le squelette fibreux entourant les valves cardiaques et formant le noyau fibreux de cloison interventriculaire [8].

Les cellules myocardiques sont particulièrement sensibles aux radicaux libres car elles sont pauvres en agents anti-oxydants comme la catalase et le superoxyde dismutase [9].

- **L'endocarde**

Une fine couche d'endothélium, un tissu de type épithélial qui tapisse la totalité de l'appareil circulatoire [10].

- **Le péricarde**

Le péricarde est la couche la plus extérieure. Il est constitué d'un sac externe fibreux et d'un sac interne composé d'une double couche de membrane séreuse [10].

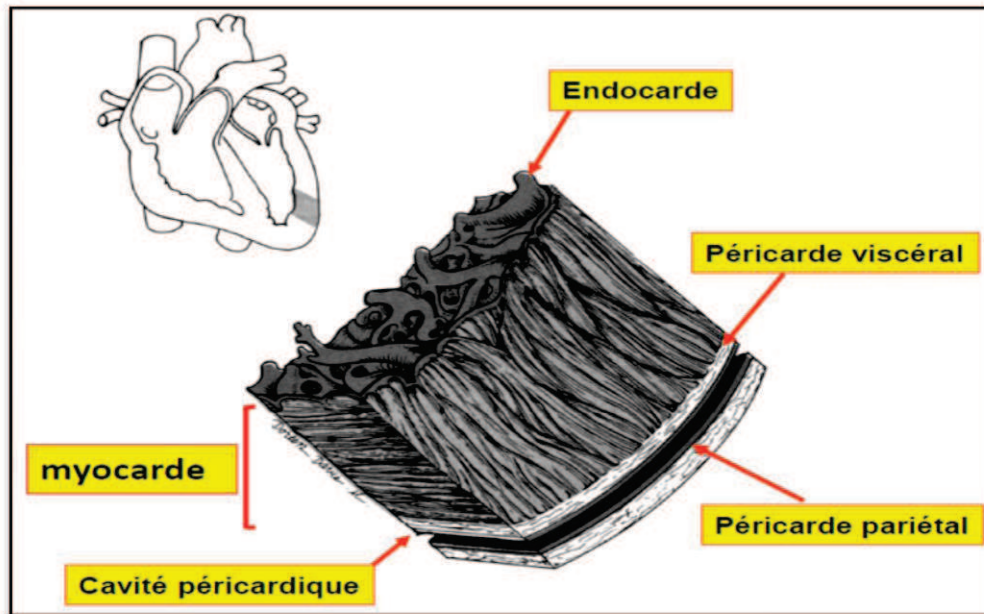


Figure 02 : Les tuniques cardiaques [11].

- **Au niveau cellulaire**

Le cœur est composé de trois types de cellules :

- les cardiomyocytes
- les fibroblastes
- et les cellules endothéliales.

Les cardiomyocytes occupent environ 75% du volume cardiaque mais représentent en nombre seulement 20% des cellules cardiaques. Il existe 3 types de cardiomyocytes :

Les cardiomyocytes contractiles permettant la fonction de contraction, les cellules cardionectrices (cellules nodales et cellules de Purkinje) spécialisées dans l'initiation et la conduction de l'excitation, et les cellules myoendocrines qui assurent la fonction endocrine.

Les cardiomyocytes adultes sont des cellules spécialisées, différenciées et qui ont perdu la capacité de se diviser [12]. Et constitués d'un cytoplasme riche en protéines et ions, d'un réticulum sarcoplasmique compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium, et d'une grande quantité de mitochondries qui constituent la réserve énergétique indispensable au fonctionnement du cœur [13].

Outre les cardiomyocytes, le cœur est également composé de fibroblastes qui représentent en nombre 70% des cellules cardiaques [14].

I.3. Pathologies cardiaques

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 17,3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale. La maladie coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux et l'insuffisance cardiaque chronique rassemblent 75% des pathologies cardiovasculaires et sont responsables à eux seuls de 29% des décès annuels.

La plus récente classification des cardiomyopathies les définit comme des maladies du myocarde associée à une dysfonction ventriculaire. Cette nomenclature permet donc de distinguer les cardiomyopathies primitives de deux types, idiopathique et familial, qu'elles soient dilatées, hypertrophiques, restrictives, et les cardiopathies secondaires à une cause infectieuse, endocrinienne, métabolique, toxique ou infiltrative [15].

II. La Doxorubicine

II.1. Généralité

En 1963, Di Marco détecte une activité antitumorale d'une nouvelle classe d'antibiotiques sur certains modèles de tumeurs murines. Le nom d'anthracyclines leur sera attribué. Ces molécules sont fluorescentes et de couleur rubis (suffixe –rubicine) [16]. Elles ont été extraites à partir de cultures de différents streptomyces isolés d'échantillons de sol, en Italie près de la mer Adriatique (préfixe adria-) et en France [17]. Elles combinent un noyau polyaromatique tétracyclique de type aminoglycoside et un sucre aminé, la daunosamine [18].

Les anthracyclines sont des agents cytotoxiques possédant un large spectre d'activité, utilisées dans une grande variété de cancers, telles que les hémopathies (leucémies aiguës lymphoïdes et myéloïdes, lymphomes) et les tumeurs solides (cancers du sein, de l'ovaire, gastriques, sarcomes) [19]. Elles sont administrées par voie intraveineuse, en infusion lente, à des doses variables modulée selon la surface corporelle, le type de cancer considéré et des doses antérieurement reçues. La durée du traitement est également variable en fonction du cancer traité, de la réponse obtenue et de l'âge des patients [20].

II.2. Définition de la doxorubicine

La doxorubicine est le membre le plus connu et le plus utilisé des Anthracycline le groupe des antibiotiques d'agents anticancéreux. Il a été présenté pour la première fois Dans les années 1970, et depuis ce temps est devenu l'un des médicaments plus couramment utilisé pour le traitement des tumeurs hématologiques et solides [1].

La daunorubicine a été la première anthracycline, suivie quelque temps plus tard de la doxorubicine, qui est la molécule de référence de loin la plus utilisée pour les tumeurs solides à ce jour [21].

C'est un agent intercalant, inhibe la réplication et la transcription de l'ADN, à l'origine de l'effet cytotoxique. Ils génèrent également la production des radicaux libres et des liaisons non dissociables aux topoisomérases II, entraînant des cassures mono et bi-caténares de l'ADN également à l'origine de l'effet cytotoxique [22].

En 1964, les premiers essais cliniques sur l'homme furent tentés. La toxicité cardiaque dose dépendante potentiellement fatale fut mise en évidence dès 1967. Les aspects cliniques de la cardiotoxicité liée à l'utilisation des anthracyclines sont bien connus depuis les années 70 [17].

II.3. Structure moléculaire

La doxorubicine est un antibiotique anthracyclinique possède la structure polyaromatique des tétracyclines avec un aminosucre, la daunosamine qui est attachée par une liaison glycosidique. Les agents cytotoxiques de cette classe ont tous une structure quinone et hydroquinone, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons [23].

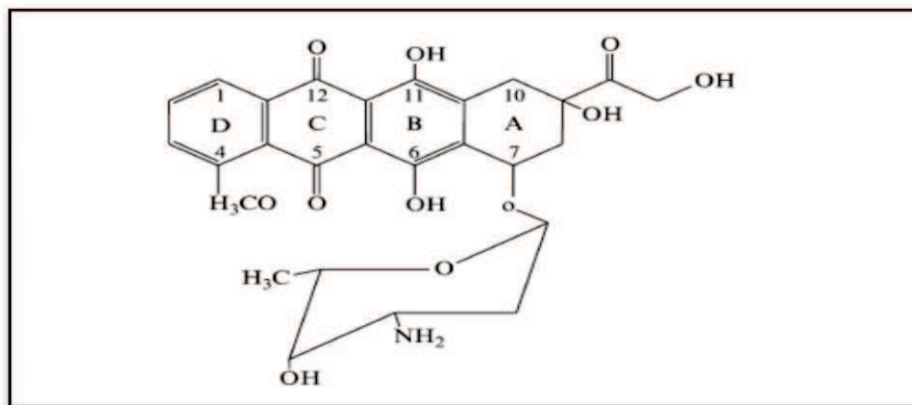


Figure 03 : La structure chimique de la doxorubicine [1]

II.4. Les raisons d'utiliser ce médicament

La doxorubicine est utilisé seul ou en association avec d'autres médicaments anticancéreux pour provoquer la régression de plusieurs types de tumeurs cancéreuses. Pour le traitement des tumeurs superficielles de la vessie, la doxorubicine est administré directement dans la vessie [24].

II.5. La pharmacocinétique de la Doxorubicine

II.5.1. L'absorption et distribution

- La doxorubicine est injectée par voie intraveineuse.
- Liaisons aux protéines : 80 %. Tissulaire et rapide
- Ce médicament est rapidement distribué aux divers tissus du corps où il est concentré dans les noyaux des cellules, la concentration est élevée dans le foie et le cœur, les poumons, les reins, la rate et l'intestin grêle, tandis qu'une faible concentration dans le cerveau.
- La demi-vie de distribution initiale d'environ 5 minutes, tandis que son élimination est lente à partir des tissus qui se traduisent par une demi-vie terminale de 20 à 48 heures. La doxorubicine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique [25].

II.5.2. Métabolisme hépatique

Elle est extensivement métabolisée, majoritairement au niveau hépatique par hydroxylation catalysée par des monooxygénases à cytochrome P450 (principalement le CYP3A4 et le CYP2D6) en doxorubicinol, métabolite actif, et comprend plusieurs des interactions [26] :

- réduction de la Fonction carbonyle (C = O) de l'atome de carbone numéro 13 dans de la chaîne latérale de la doxorubicine à un groupement alcoolique (OH) et cela par stimulation de l'enzyme cytoplasmique (NADPH-dépendent Aldo-céto réductase) et formation du métabolite hydroxy doxorubicine (figure 12), nommé doxorubicinol qui est le principal métabolite actif de ce médicament [27].
- déglycosylation en activant l'enzyme cytochrome P450 réductase et formation de hydroxy aglycones ou déoxy aglycones.
- Ensuite la doxorubicine et ses métabolites sont excrétés par la bile sous forme de DOXO ou doxorubicinol après 24Heures d'absorption ou bien sous forme de sulfates et glucuronides après 48Heures.

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

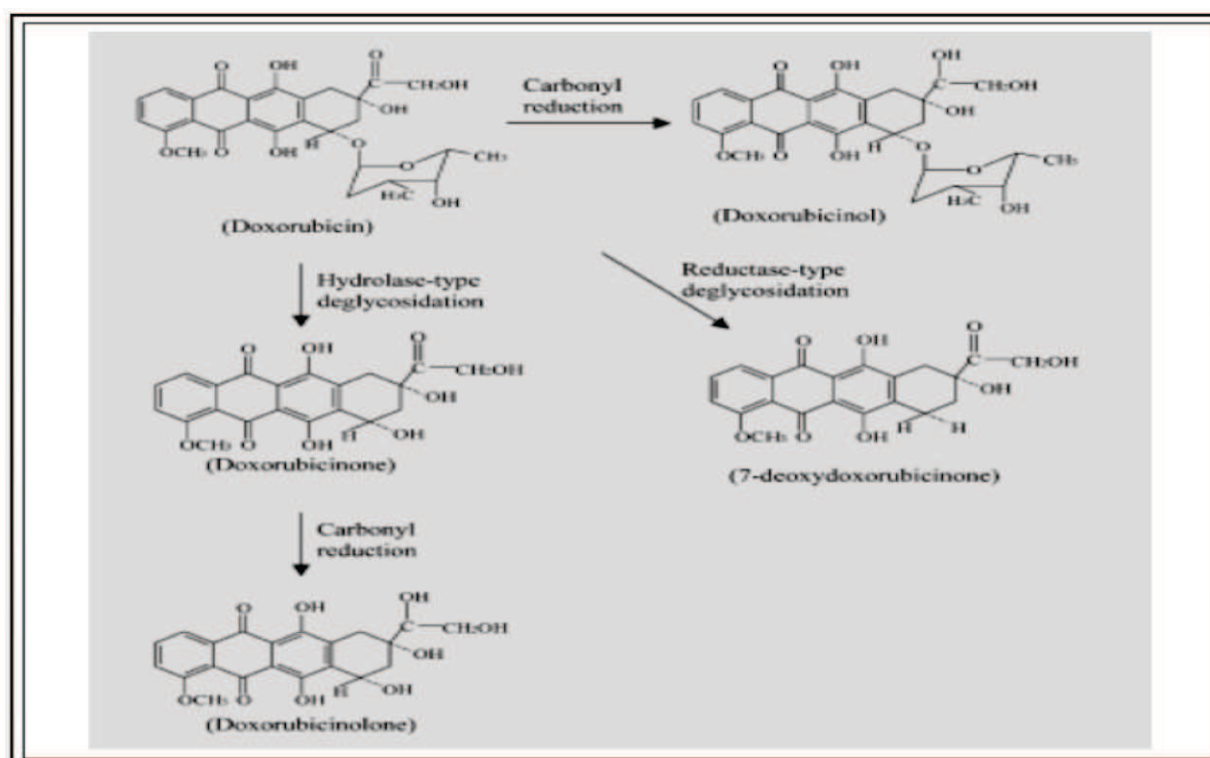


Figure 04 : métabolisme hépatique de la Doxorubicine [27]

II.5.3. L'élimination

L'élimination biliaire. Environ 40% de la dose apparaît dans la bile en 5 jours, alors que seulement 5 à 12% du médicament et de ses métabolites apparaît au cours de la même période de temps dans l'urine [27].

La courbe d'élimination de la doxorubicine est multiphasique, et le temps d'élimination est de 30 h. Ces substances sont rapidement captées par différents organes : principalement le cœur, seraient excrétés majoritairement par la bile. Cependant, 5% serait excrété par les voies urinaires ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine [28].

II.6. Mode d'action

La doxorubicine agirait sur les cellules selon plusieurs modes d'action. Tout d'abord, près de 99.8% de son accumulation se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN [29].

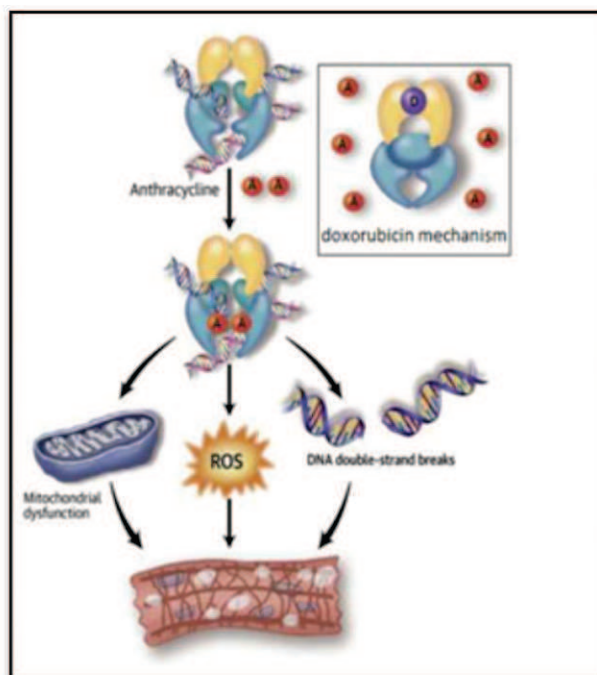


Figure 05 : Mécanismes de cardiotoxicité induite par la doxorubicine [30]

II.6.1. L'interaction avec les bases azotées de l'ADN

La DOXO s'insère entre deux paires de bases azotées, modifiant ainsi la structure de l'ADN [31], ce changement conduit à entraver la corrélation enzymatique, les enzymes de réplication de l'ADN polymérase, des enzymes de clonage ARN polymérase, les enzymes de réparation de l'ADN, et inhibent ainsi les processus de réplication [32].

II.6.2. Inhibition de l'enzyme topo-isomérase II

La doxorubicine se relie avec le topo-isomérase II par des liaisons covalentes stables (irréversibles) formant ainsi le complexe topo-isomérase II -ADN-DOXO qui inhibe l'enzyme topo-isomérase II ce qui conduit à la mort cellulaire [33].

II.6.3. Inhibition de l'enzyme hélicase

Une hélicase est une enzyme qui catalyse le dénouement de la double hélice d'ADN pour permettre la réplication. Des nouvelles études estiment l'inhibition de cet enzyme par la doxorubicine [34].

II.6.4. Production des radicaux libres

La production des radicaux libres après fixation sur l'ADN entraîne de nouvelles lésions, de l'ADN, localement, mais aussi à distance (membranes, mitochondries) [35].

Les composés de dégradation de la Doxorubicine entraîneraient la formation des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Ces radicaux libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires [36].

II.6.5. Transport nucléaire

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

II.6.6. L'apoptose

L'action proapoptotique des anthracyclines est en partie initiée par les radicaux libres, qui activent la protéine p53 et sa fixation sur l'ADN. La p53 y active la transcription du gène Bax (médiateur 35 proapoptotique), inhibe celle du gène Bcl-XL (médiateur antiapoptotique). Bax induit la libération du cytochrome c par la mitochondrie, par ouverture du pore mitochondrial, tandis que Bcl-XL a l'effet inverse. Cette libération du cytochrome c entraîne la formation de l'apoptosome, complexe effecteur comprenant l'apoptosis activating factor-1 (Apaf-1), le cytochrome c et la pro-caspase-9. La p53 interagit aussi avec la topoisomérase II, dont elle inhibe la fonction ligase [35].

III. La cardiotoxicité

Le mécanisme de la cardiotoxicité des anthracyclines n'est pas parfaitement connu. Elle pourrait résulter d'une formation des radicaux libres superoxydes ou d'une toxicité cellulaire par lésions membranaires.

Deux types de toxicité cardiaque sont individualisées : aiguë et chronique [37] :

III.1. La cardiotoxicité aiguë et subaiguë

Elle survient immédiatement ou dans les heures et jours après l'injection et consiste en plusieurs types d'effets : troubles du rythme, de la conduction observés dans 1/3 des cas et disparaissant avant la cure suivante [38], syndrome péricardite et myocardite très rare mais léthal dans 1/4 des cas, atteintes myocardiques transitoires pouvant aboutir à une incompetence myocardique chez certains patients fragilisés et être réversible, épisodes de vasoconstriction coronaire pouvant entraîner une nécrose myocardique mais exceptionnels [39].

III.2. Toxicité chronique

La toxicité chronique des anthracyclines se manifeste entre quelques jours et 8 mois après la dernière injection (moyenne voisine de 1 mois). Elle est corrélée à la dose totale administrée ; elle est cumulative entre les différentes anthracyclines [40].

Les troubles les plus fréquents sont des troubles du rythme, une cardiomyopathie. Le risque de toxicité cardiaque est accru en cas de facteurs de risques associés :

- combinaison à d'autres cytotoxiques cardiotoxiques .
- antécédents de radiothérapie thoracique ou de pathologie cardiovasculaire.
- sujet jeunes ou âgés [37].

III.3. Aspects biochimiques de la cardiotoxicité des anthracyclines

La meilleure connaissance des mécanismes d'action cellulaire des anthracyclines a permis de démontrer que l'activité antitumorale et la cardiotoxicité correspondaient en fait à des cibles intracellulaires différentes. En effet, il est classiquement admis que le mécanisme principal de cytotoxicité des anthracyclines envers les cellules tumorales est lié à l'intercalation du médicament au niveau de l'ADN, et à l'inhibition de l'enzyme nucléaire, la topoisomérase II. Or, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules cardiaques. Ce constat, ainsi que l'importance de la cardiotoxicité ainsi engendrée, ont conduit à la recherche d'autres mécanismes susceptibles de rendre compte de la toxicité cardiaque des

anthracyclines. Plusieurs hypothèses sont alors avancées, que nous rapporterons dans cette revue [41].

III.3.1. Inhibition de la topoisomérase II

La topoisomérase II est une enzyme régulant l'état d'enroulement de l'ADN en générant des coupures double brin transitoires de l'ADN. Elle est indispensable à différents processus cellulaires tels que la réplication, la transcription, la condensation de la chromatine et la ségrégation chromosomique [42].

Elles sont classées en deux types d'enzymes I et II.

Les changements topologiques de l'ADN nécessitent l'introduction de cassures double brin transitoires produites par les topoisomérases II sans générer de dommages à l'ADN.

Ce mécanisme est décrit dans la figure 06.

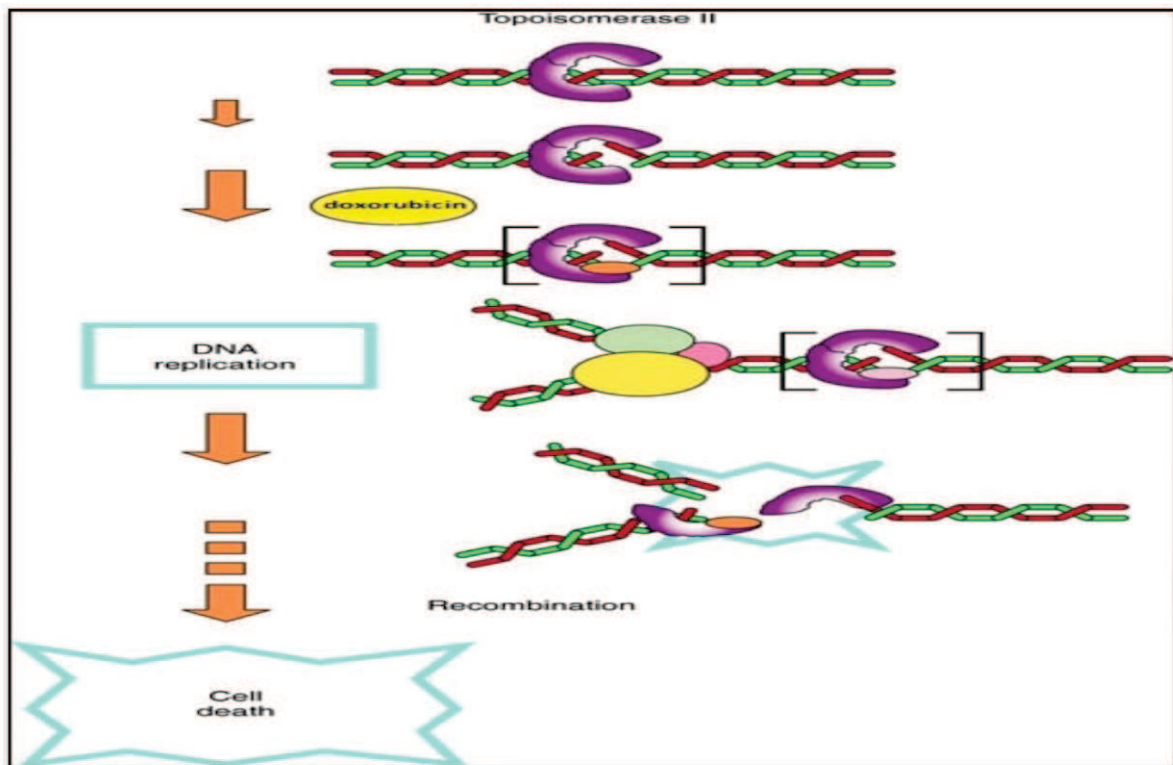


Figure 06: Mécanisme d'action de la topoisomérase II [43]

Les cassures de l'ADN par la doxorubicine sont principalement double-brins et s'effectuent par l'intermédiaire de complexes [ADN- doxorubicine -protéine] [44].

La doxorubicine s'intercalé entre des nucléotides adjacents le long de l'ADN formant une interaction étroite **ADN-médicament**. Cette interaction perturbe la synthèse et la transcription de l'ADN par la stabilisation du complexe transitoire de clivage [DNA-enzyme].

L'inhibition de cette enzyme provoque un arrêt du cycle cellulaire en G1/M, puis des aberrations chromosomiques, des échanges entre chromatides sœurs et la mort cellulaire. La topoisomérase II présente des sites prévalant de clivage [45].

Il existe deux isoformes de la topoisomérase II: la TopII α exprimée dans les cellules prolifératrices et impliquée dans la réplication de l'ADN et la ségrégation chromosomique et la TopII β impliquée dans la transcription et la réparation des cassures de l'ADN.

Il est à noter que certains types de cellules cancéreuses surexpriment la TopII α . Le ciblage de celle-ci par les anthracyclines permet ainsi de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses et la croissance tumorale. Néanmoins, les anthracyclines inhibent également la TopII β , exprimée dans le cœur et participeraient ainsi à leurs effets cardiotoxiques [46].

III.3.2. Induction d'un stress oxydant

Le mécanisme de cardiotoxicité induite par la doxorubicine le plus largement étudié est la génération d'un stress oxydant. En effet, la doxorubicine produit des radicaux libres et plus particulièrement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via différents mécanismes [47, 48].

La doxorubicine peut être réduite en un dérivé semi-quinone radicalaire par les flavoprotéines (telles que la NADH déshydrogénase ou la NADPH réductase mitochondriale) ou par la libération d'un électron suite à la liaison de la doxorubicine à l'ADN. Ce dérivé peut alors subir une deuxième réduction pour former une hydroquinone ou bien pour revenir à sa forme quinone grâce à une réaction d'oxydation catalysée par une NADPH oxydase. Cette réaction aboutit à la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$). La dismutation du $O_2^{\bullet-}$ conduit à la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette réaction peut être catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) ou peut se produire de façon spontanée [49]. Le peroxyde d'hydrogène est une molécule stable qui peut être éliminé par la catalase ou la glutathione peroxydase. Cependant, l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent générer des

radicaux hydroxyles, très réactifs et très toxiques par la réaction d'Haber-Weiss. Cette réaction, lente, peut être catalysée par certains métaux et plus particulièrement le fer [50].

Le deuxième mécanisme d'induction de stress oxydant implique la formation de complexes DOXO-Fer. En effet, le complexe Dox-Fe³⁺ peut être réduit notamment par la NADH cytochrome P450 réductase en DOXO-Fe²⁺ qui peut réagir avec l'oxygène et former du O₂^{•-}.

Sa dismutation entraîne la production d'H₂O₂ qui formera des radicaux hydroxyles par la réaction d'Haber-Weiss [51].

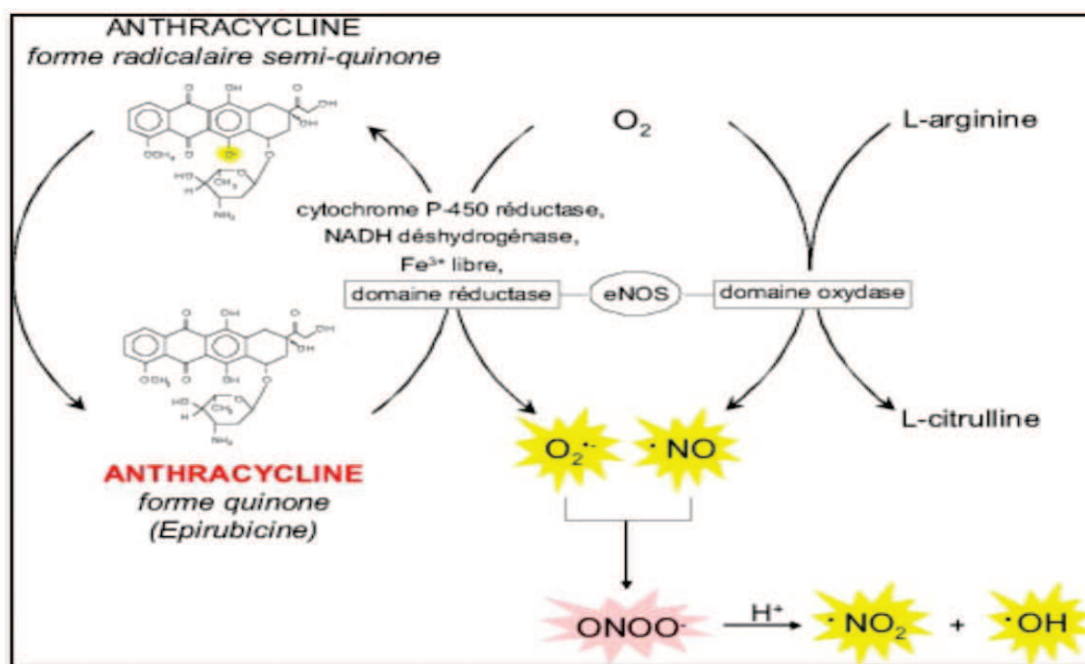


Figure 07: Production des radicaux libres par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines [41]

La doxorubicine peut également altérer le métabolisme du fer et ses protéines. La doxorubicine inactive les protéines IRP1 et 2 (Iron regulating protein) et augmente *in vivo* la synthèse de ferritine (Protéine permettant le stockage du fer) [35]. L'augmentation de la synthèse en ferritine serait ainsi un mécanisme de défense limitant l'accumulation de fer qui peut être délétère [52].

En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'accumulation de fer potentialise la cardiotoxicité induite par la doxorubicine. [53. 54].

Les patients atteints de cardiomyopathie induite par la doxorubicine ont également un taux de fer mitochondrial élevé et participerait à la voie apoptotique mitochondriale dépendante des ROS [55].

La doxorubicine peut également produire via une production importante de ROS et de monoxyde d'azote (NO) des espèces réactives de l'azote (RNS) et plus particulièrement le peroxyde d'azote (ONOO^-) [56].

La production de ces radicaux libres entraîne l'oxydation de divers types de macromolécules dont les lipides, les protéines, les acides nucléiques et altère ainsi la fonction de tous les constituants cellulaires situés à proximité des lieux de leur formation et notamment du noyau, des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique.

III.3.3. Apoptose

L'apoptose est un second mode physiologique de mort cellulaire programmée. Ce type de mort est impliqué dans des fonctions physiologiques contribuant au maintien de l'homéostasie en programmant la destruction des cellules [57]. Les anthracyclines pouvaient conduire à une perte de cellules cardiaques par apoptose qu'affecte moins de 1 % des myocytes cardiaque, cette apoptose induite était associée à une activation de la caspase 3 et à une augmentation du ratio Bcl2/Bax [58].

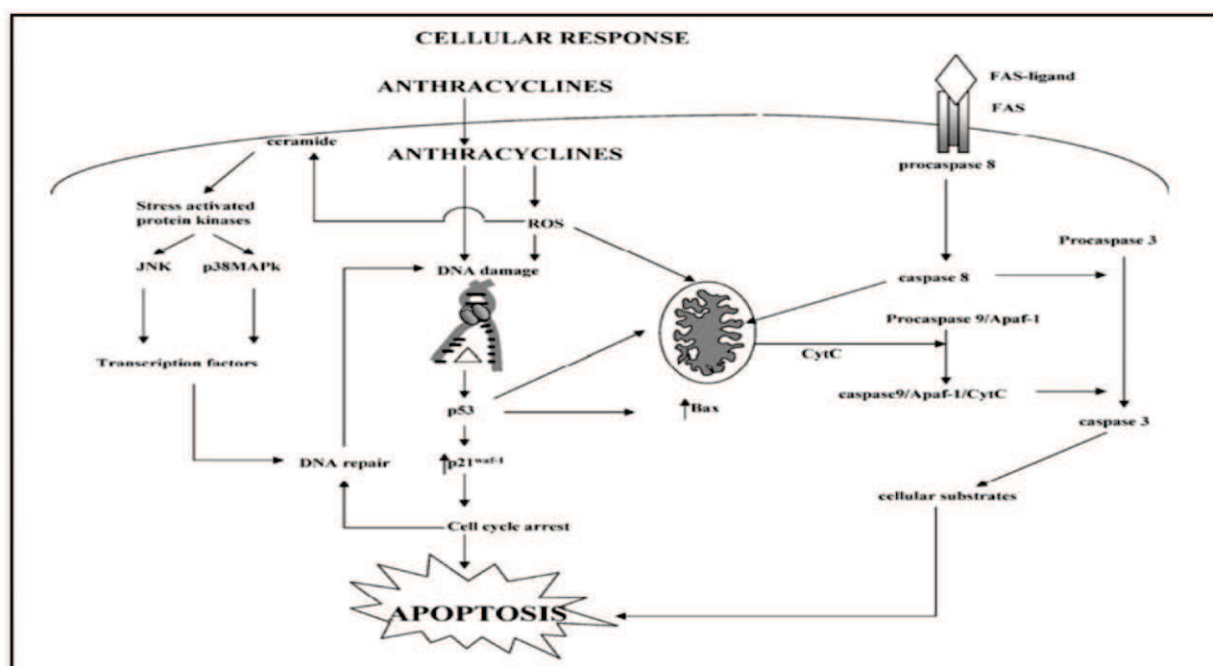


Figure 08: Théorie de métabolites toxiques des anthracyclines [59]

III.4. Hypothèse des métabolites toxiques issus du métabolisme de la doxorubicine

La formation de radicaux libres est déterminante pour expliquer la toxicité cardiaque, et moins la cytotoxicité antitumorale. Elle aboutit à la peroxydation des lipides des membranes mitochondriales et du réticulum sarcoplasmique par liaison avec le diphosphatidyl-glycérol. Les cellules myocardiques sont très riches en mitochondries et très pauvres en enzymes protectrices des radicaux libres comme la catalase ou le superoxyde dismutase [60].

Enfin, sur le plan métabolique, la doxorubicine subit un processus d'oxydo-réduction par une C13 aldocétoréductase, présente dans le cœur, mais absente du plasma, qui transforme la doxorubicine en doxorubicinol, métabolite moins actif que la molécule-mère sur le plan tumoral mais plus toxique sur le cœur par son action sur la pompe à calcium du sarcoplasme [61].

Ce métabolite est capable d'inhiber certaines ATPase Ca^{2+} -dépendantes du réticulum sarcoplasmique. Ce métabolite, une fois formé dans les cellules, peut altérer les mouvements ioniques membranaires, en particulier les transferts calciques [62].

III.5. Aspects histologiques des lésions cardiaques induites par les anthracyclines

Sur le plan physiopathologique, l'étude histologique de biopsies endomyocardiques de tissus atteints met en évidence des altérations caractéristiques [63] :

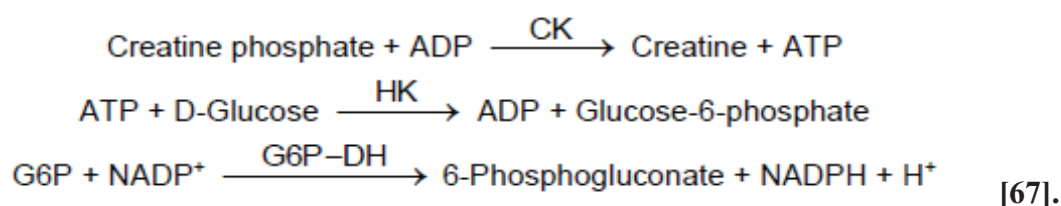
Des anomalies quantitatives et qualitatives des cardiomyocytes ont été observées, les myocytes apparaissent petits, rétractés avec un cytoplasme présentant une accumulation lipidique, des lysosomes nombreux, une perte myofibrillaire ; déformation du réticulum sarcoplasmique, formation de vacuoles cytoplasmiques, distorsions myofibrillaires, raréfaction des myofibrilles associées à une nécrose myocardique, et une dégénérescence nucléaire surviennent, conduisant à la mort cellulaire [64].

III.6. Les biomarqueurs

III.6.1. CPK

La créatine kinase(CK) ou créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme cellulaire avec une large distribution tissulaire dans le corps [65]. Leur rôle physiologique est associé à la génération d'adénosine triphosphate (ATP) pour Contractile ou de transport [66].

La créatine kinase (CK) catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate de Phosphocréatine à l'ADP selon la réaction [65] :



L'activité catalytique de la CK est déterminée en mesurant la vitesse d'apparition du NADPH+H⁺ à 340 nm.

Il existe plusieurs isoenzymes de la CK. Principalement trois fractions sont connues :

- CK-MM qui se trouve en majorité dans le tissu musculaire.
- CK-MB qui se trouve en majorité dans les cellules myocardiques.
- CK-BB qui se trouve en majorité dans le cerveau.

Des valeurs élevées de CK sont observées dans les maladies du muscle squelettique et après Infarctus du myocarde [68].

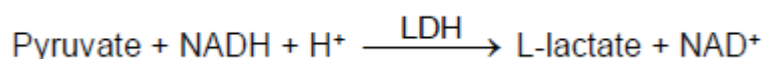
La CK-MB (ou CPK-MB) est libérée en cas d'infarctus du myocarde, le taux de CPK-MB s'élève à partir de la troisième ou quatrième heure après le début de l'infarctus et se normalise en deux à trois jours [69].

III.6.2. LDH :

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme présente dans tout l'organisme humain. Les plus grandes concentrations de LDH se trouvent dans le foie, le cœur, les reins, le muscle squelettique et les érythrocytes [70].

Le niveau de LDH dans le sérum est élevé chez les patients avec des maladies du foie, des infarctus du myocarde, des troubles rénaux, des dystrophies musculaires et des anémies [71].

Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction suivante :

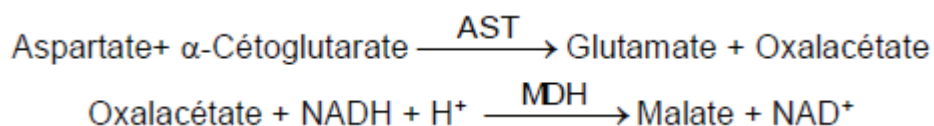


La vitesse de diminution de la teneur en NADH dans le milieu déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de LDH dans l'échantillon testé [70].

III.6.3. Les Aminotransférases

AST / TGO

L'aspartate amino transférase (AST), initialement appelée transaminase glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et d'oxalacétate. L'oxalacétate produit est réduit en malate en présence de déshydrogénées (MDH) et NADH :



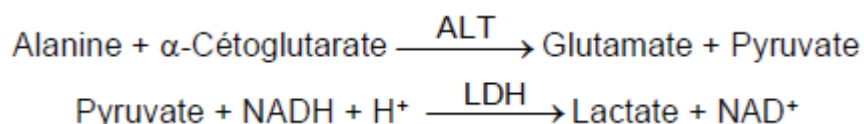
La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photo numériquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'AST dans l'échantillon [72].

L'AST est une enzyme intracellulaire, qui se trouve en grandes quantités dans les muscles du cœur, les cellules du foie, les cellules du muscle squelettique et en plus faibles quantités dans les autres tissus [66].

Bien qu'un niveau élevé d'AST dans le sérum ne soit pas caractéristique d'une maladie hépatique, elle s'emploie principalement pour les diagnostics et le suivi, avec d'autres enzymes telles que l'ALT. Elle s'utilise également dans le cadre du contrôle post-infarctus, chez les patients souffrant de troubles musculaires du squelette et dans certains autres cas [68].

ALT / TGP :

L'alanine aminotransférase (ALT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique d'alanine vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et NADH :



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALT dans l'échantillon [72].

L'ALT est une enzyme intracellulaire, qui se trouve principalement dans les cellules du foie et des reins. Son meilleur avantage est le diagnostic de maladies du foie [66].

On l'observe en grandes quantités dans le cadre de maladies hépatiques, telles que l'hépatite, les maladies du muscles et des infarctus du cœur, étant donné que la valeur de l'ALT reste dans les limites standards et augmente dans les niveaux de AST [68].

III.7. Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines

Afin de prévenir les effets cardiotoxiques de la doxorubicine, différentes stratégies peuvent être employées :

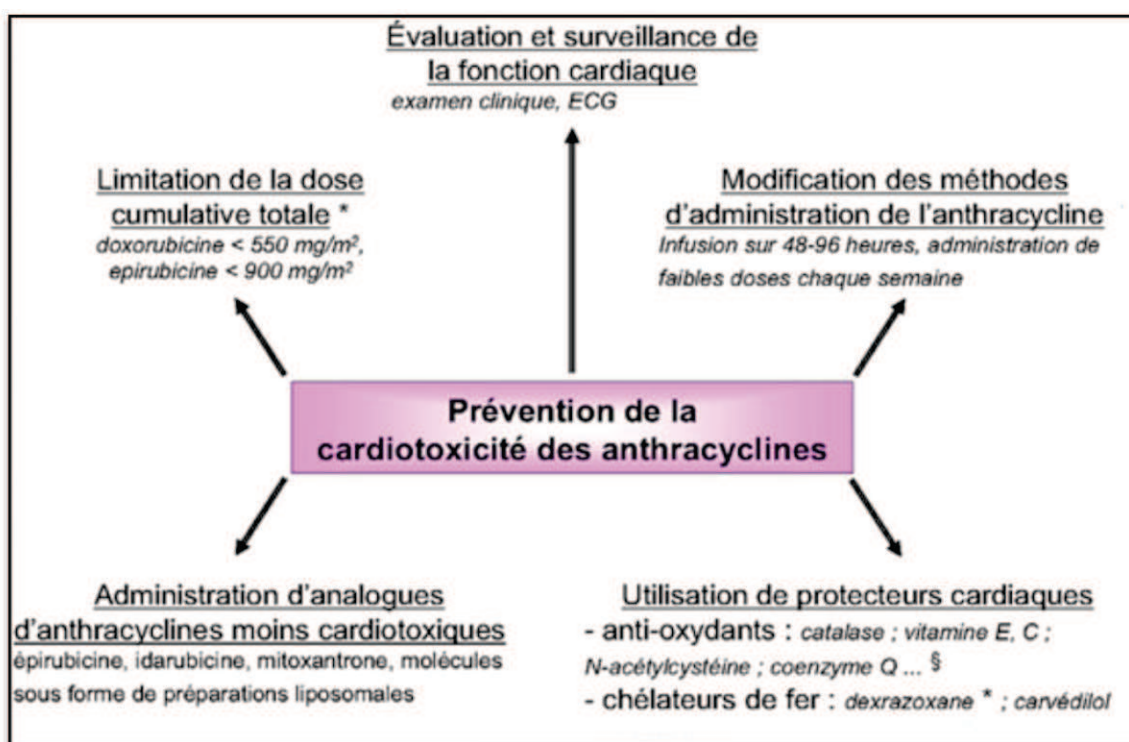


Figure 09: Stratégies pour prévenir la cardiotoxicité induite par l'administration d'anthracyclines [41]

III.7.1. Diminution de la dose cumulée totale de la doxorubicine

La diminution de la dose cumulée totale de doxorubicine chez l'adulte est à ce jour la prévention la plus efficace contre les complications cardiaques.

- **Mode d'administration de la doxorubicine**

Une autre approche consiste à modifier le protocole d'administration de la doxorubicine. Ainsi, une perfusion continue sur plusieurs jours plutôt qu'une injection en bolus permet de diminuer les risques de complications cardiaques [73]. Toutefois, cette méthode est controversée chez les patients pédiatriques [74].

- **Utilisation d'antioxydants**

L'hypothèse prédominante de la formation des radicaux libres associée à la cardiotoxicité induite par les anthracyclines a conduit les recherches à s'orienter vers l'utilisation d'antioxydants afin de limiter la production d' $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et OH .

Plusieurs composés, possédant des propriétés antioxydantes, se sont révélés cardioprotecteurs [75].

La N-acétylcystéine, la vitamine C et la vitamine E possèdent des effets bénéfiques sur un modèle de cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez l'animal. En revanche, ils ne préviennent malheureusement pas les dommages myocardiques chez l'homme [76].

IV. *Salvia Officinalis*

IV.1. Définition

Salvia est une plante annuelle et biannuelle d'origine méditerranéenne de la famille des labiées [77]. Il existe environ 900 espèces identifiées autour du monde [78]. En Algérie les espèces qui ont été déterminées sont dans l'ordre d'une trentaine. Plusieurs appellations ont été données à la sauge. Selon Ibn El Beytar, les andalous la nomment "essalma" qui ajoute qu'elle est appelée "salbia" par les botanistes en Espagne. El djazairi indique l'expression "souek ennebi" comme synonyme de Saleme

IV.2. Description morphologique

Cette plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80cm, rameaux vert-blanchâtre. Feuilles assez grandes, épaisses, vert-blanchâtres; couvert de poils denses, et opposées; fleurs bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Calice campanulé à 5 dents longues et corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée; fruits en forme de tétrakènes [79].



Figure 10: la plante de *Salvia Offisinalis L* (sauge)

IV.3. Répartition géographique

Les espèces *Salvia* représentent un groupe d'espèces cosmopolites, qui montrent une gamme remarquable de variation [80]. Ce genre est distribué dans trois régions principales dans le monde 530 espèces à l'Amérique centrale et latine, 250 espèces en Asie centrale et en régions méditerranéennes, 30 en Afrique du Sud et 90 espèces en Asie de l'Est (figure11) [81].

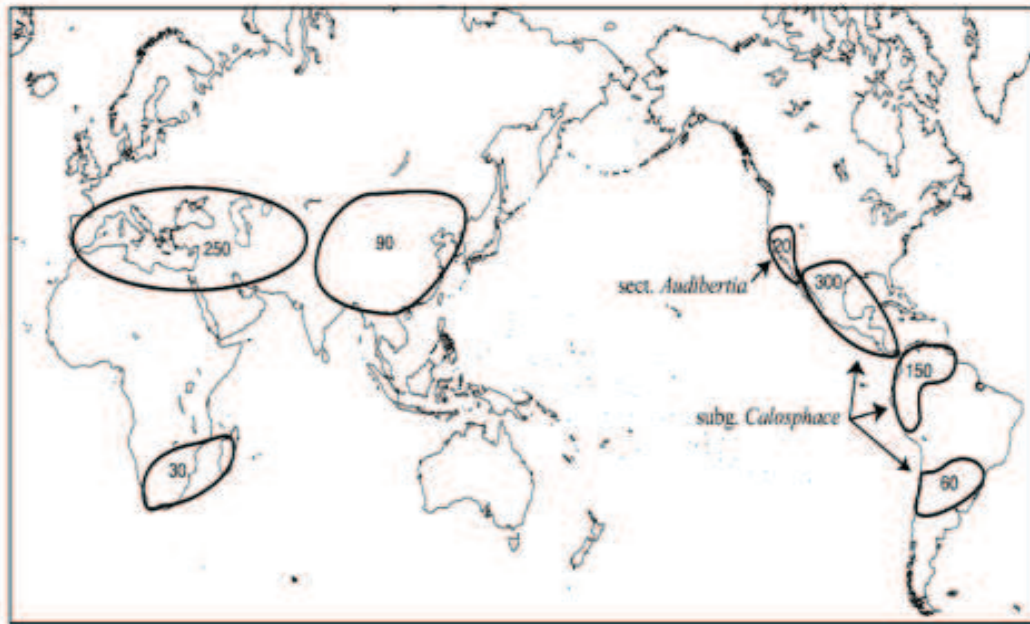


Figure 11 : Répartition géographique du genre *Salvia* dans le monde [81]

IV.4. Classification taxonomique

Tableau 01: Classification de la plante [82, 83]

Règne :	Plantae (végétal).
Embranchement :	Cormophytes.
Division :	Magnoliophyta.
Classe :	Magnoliopsida .
Sous-classe :	Asteridae.
Ordre :	Lamiales .
Famille :	Lamiaceae.
Genre :	Salvia.
Espèce :	<u>Salvia officinalis L</u>

IV.5. Les principaux constituants

La Sauge officinale est riche en huiles essentielles que l'on extrait par distillation. Les feuilles renferment également de nombreux Composants chimiques tels que :

- Flavonoïdes
- Essence aromatique
- saponine
- tanins
- résine
- vitamines
- œstrogène
- asparagine [84].

IV.6. Utilisation traditionnelle

L'appellation latine démontre bien l'importance de la sauge dans la pharmacopée traditionnelle. En effet *Salvia* en latin signifie guérir et "salvare" qui veut dire sauver. *Salvia* a toujours été considérée comme une plante magique qui sauve des vies humaines [85].

Salvia officinalis : Arômes. Remède efficace en gargarisme. Elle peut calmer les crises de la maladie d'Alzheimer et a une activité tranquillisante, antiseptique et astringente. Régularise le cycle menstruel, la transpiration, les bouffées de chaleur et modifications hormonales. Les feuilles séchées à fumer contre l'asthme, morsures, piqûres, diarrhées, sueurs nocturnes, Aphtes et angines [86].

Une décoction de racines est utilisée en cas de maladies cardiaques et lors de la ménopause, et aussi pour la cicatrisation des plaies.

Elle est utilisée dans la prise en charge de différents problèmes digestifs. Aussi comme antiviral, anti tumoral, antispasmodique, antioxydant, céphalique, fébrifuge, les traitements anti-inflammatoires et des troubles mentaux et nerveux. Elle est également ajoutée comme désinfectant, cataplasmes et dans certains bains contre les maladies de la peau d'origine mycosique et pour des raisons encore mystérieuse. Elle semblerait efficace contre l'asthénie consécutive à une maladie [87].

IV.7. Toxicité

La plante peut être toxique sous toutes ses formes fraîche et sèche, jeune ou en fleur [88]. Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Ces expositions se font par ingestion, par contact, par inhalation qui peut induire ou aggraver des problèmes respiratoires (une diminution de la fonction pulmonaire et une augmentation de la sensation de poitrine oppressée, une respiration sifflante et augmenter l'asthme chez les populations sensibles) [89].

Actuellement aucune étude expérimentale n'a démontré l'effet de l'extrait butanolique de cette plante (EBSO) sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine.

V. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini par le déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et les antioxydants (mécanismes de protection) [90].

La balance oxydative définit donc l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces antioxydants [91]. Son déséquilibre est sujet de nombreux problèmes comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [92]. Cette balance est dynamique et est maintenue dans son bon équilibre par des mécanismes enzymatiques ou par des apports extérieurs des molécules très actives [93].

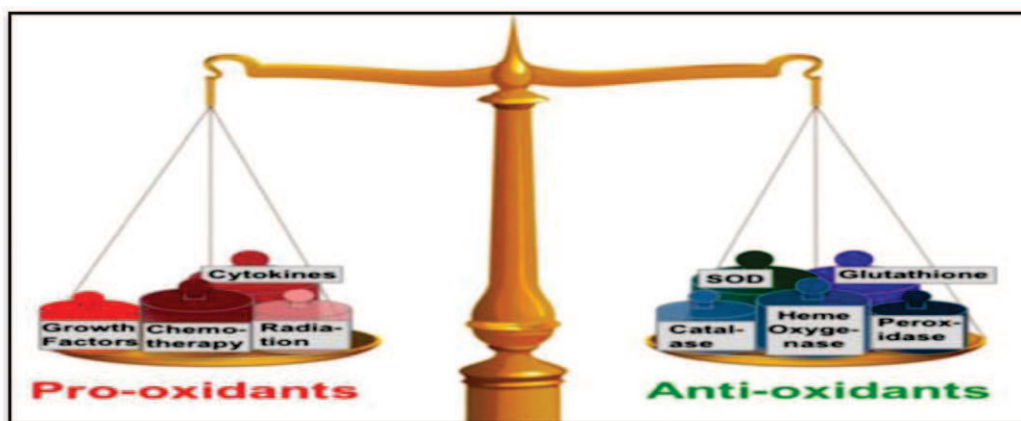


Figure 12 : Modèle d'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants [90]

V.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces très réactives compte tenu de l'existence d'au moins un électron libre sur leur orbitale électronique externe [94]. Ils peuvent également causer des dommages cellulaires, plusieurs moyens de défense ont évolué pour protéger nos cellules contre les radicaux et pour réparer les dommages de l'ADN [95].

V.2. Les antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme étant toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [96]. En d'autres termes, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ROS), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. La production excessive des espèces réactives de l'oxygène est responsable de dégâts cellulaires importants notamment l'induction de ruptures et de mutations de l'ADN, la modification de

structures protéiques, la peroxydation des lipides, l'inactivation de diverses enzymes et l'oxydation des sucres [97].

V.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction des radicaux ou des peroxydes, la chélation des métaux de transition [98].

V.3.1. Antioxydants enzymatiques

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène [99]:

- Le superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [100].
- La catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci [101].
- Le glutathion peroxydase (GPX) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène [102].

V.3.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

a) Acide ascorbique (vitamine C)

Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène [103]. Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les α -tocophéro [104] (figure 13)

b) Tocophérols (dont la vitamine E)

Il est présent dans les membranes des cellules et les organites cellulaires, où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande [105].

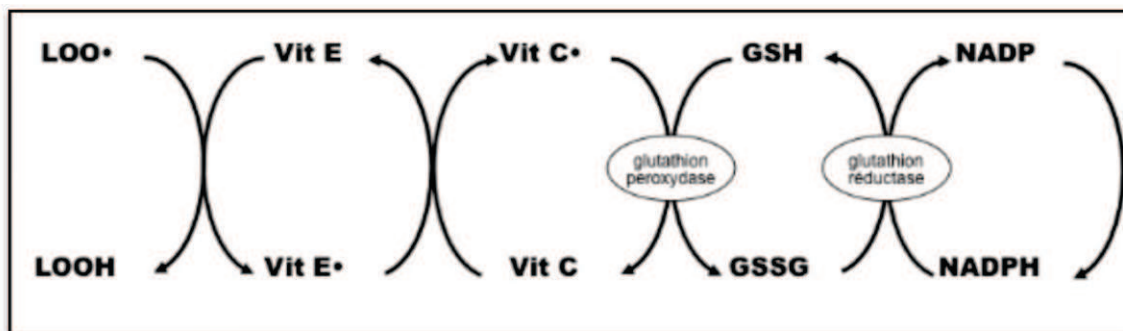


Figure 13 : Les cycles réactionnels de régénération des antioxydants [106]

c) Polyphénols

Les polyphénols sont des antioxydants complexes avec une importance croissante de la santé publique, en particulier dans les domaines de la nutrition, et de l'épidémiologie. En fonction de leur structure et les caractéristiques physico-chimiques, leurs effets bénéfiques (par exemple, anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-tumoraux) peuvent varier [107].

d) Les flavonoïdes

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation [108].

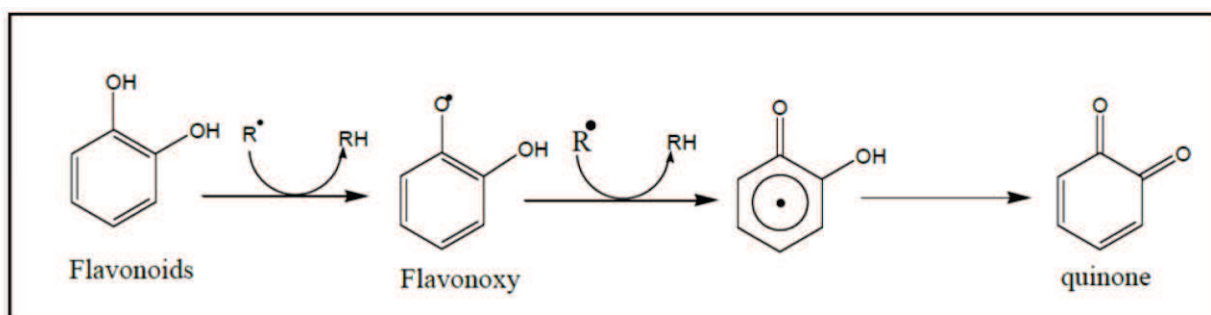


Figure 14 : L'activité anti-oxydante des flavonoïdes [109]

e) Les tanins

Les tanins sont des polyphénols qu'ils ont des propriétés antiradicalaire inhibent la peroxydation lipidique, Lors de la peroxydation les tanins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi, des radicaux taniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique [110].

Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières [111].

f) Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotées et à caractère alcalin, ils représentent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales [112]. L'étude de leur mécanisme d'action a conduit à les employer comme des antioxydants [113], les alcaloïdes sont utilisés comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux [114].

g) Les saponosides

Les saponosides parfois encore appelés saponines [115]. Ils sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile [116]. Les saponines sont connues pour leurs Activités anti-tumorales, Anti-inflammatoires, Immunostimulants, Anti-microbiennes, Insecticide (Antileishmanien) [117].

Partie II:
Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel biologique (Echantillonnage)

I.1.1. Matériel végétal

Salvia Officinalis récolté durant le printemps, que ce soit en Europe, en Asie ou en Afrique du Nord. La récolte est réalisée au mois de mai 2016, mais il est possible de récolter les feuilles de sauge toute l'année. La partie aérienne (les feuilles) est la partie nécessaire pour les faire sécher, puis elles ont été pulvérisées au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

I.1.2. Le médicament anticancéreux : la doxorubicine

Pour provoquer la cardiotoxicité chez les rats on a utilisé : la doxorubicine qu'est un médicament anticancéreux ; nous a été fourni gracieusement par le service de cancérologie de Centre Hospitalo_Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC).

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Dans nos expériences on a utilisé plusieurs réactifs chimiques et solvants, parmi ces produits:

Acide sulfurique(H_2SO_4), acide chlorhydrique (HCl), acide acétique, NaOH, NH_4OH , KI, I_2 , Na Cl, $AlCl_3$, Méthanol, eau distillée, coton. 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), diclofenac sodique, H_2O_2 , BSA (bovine sérum albumin), K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $K_3Fe(Cn)_6$, $FeCl_3$, TCA, TBA, VC, KCl, Paraffine, Xylène, Ethanol, éosine, Hématoxyline, nbutanol.

I.3. Les appareils utilisés

Spectrophotomètre UV-Visible double faisceau (JENWAY 6315 UV/VIS), Chambre d'observation UV << 264/3645 nm >>(VILBERCOURMAT), Bain Marie(MEMMERT), microtome (LEICA RM 2235); plaque chauffante ; Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOGEX), vortex (VELP), Balance

(OHAUS), microscope optique (LEICA DM 750), PH mètre, micro pipette. Homogénéisateur (ULTRA-TURRAX T 25 basic).

I.4. Matériel animal

I.4.1. Etude expérimentale

Dans cette étude expérimentale les 16 rats utilisés sont des mâles adultes de souche wister albinos, pesant entre 100 et 200 g (au début de l'expérimentation). Issus par élevage au niveau de l'animalerie de l'université des frères Mentouri de Constantine, les rats sont logés dans 4 cages métalliques, chaque cage regroupe 4 rats. Ils ont libres accès à l'eau et la nourriture. Les rats sont maintenus à une température ambiante 30C° et photopériode de 8h à 16h. Ils ont été traités conformément au principe énoncés dans le manuel sur les soins et l'utilisation des animaux d'expérimentation.

II. Méthodes

II. 1 .Screening phytochimique de l'extrait végétale

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait butanolique de la plante de *Salvia Officinalis* (EBSO).

II.1.1. Mise en évidence des tanins

Dans un tube à essai on a mis : 2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ a 2%. La réaction donne une coloration bleue noir en présence des tanins et un précipite (laisse reposer quelques minutes) [118].

II.1.2. Mise en évidence des saponosides

Principe : Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable et apparait dans les solutions de saponines.

- **Test 1:** 5ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10ml d'H₂O pendant 2min. L'apparition d'une colonne de mousse d'environ 1cm et persistant pendant au moins 15 mn indique la présence de saponosides [119].

- **Test 2:** 5ml de l'extrait ont mélangés avec 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentre une couleur rouge-marron de la couche d'interface indique la présence des tris terpènes hétérosidiques [118].

II.1.3. Mise en évidence des composés réducteurs

Ce test repose sur la réaction de Keller-kiliani. On a ajouté 5ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl₃ et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl₃ à 1 ml de l'extrait. L'apparition de deux phases la première colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) indique la présence de composés réducteurs [118].

II.1.4. Mise en évidence des alcaloïdes

Ce test fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5ml d'HCl au résidu sont ajoutés à l'extrait sec et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Wagner (2g de KI et ,1.27g d'I₂ solubilise dans 100 ml d'eau distillée). La présence d'alcaloïdes se manifeste par le développement d'un trouble ou d'un précipité dans le tube [118].

II.2. Peroxydation des lipides

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

$$\text{Inhibition rate \%} = (\text{ODcontrol} - \text{ODsampl} / \text{ODcontrol}) \times 100 \%$$

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

OD sampl : est l'absorbance de l'échantillon [120].

-Test 2 : Selon la méthode de (Wong, Hashimoto, et Shibamoto, 1995) avec quelques modifications. Il a également été utilisé pour mesurer la capacité antioxydant potentielle d'extrait butanolique de *Salvia Officinalis*. L'homogénat de jaune d'œuf était utilisé comme source riche en lipide, le jaune d'œuf était composé à une concentration de 10% dans un KCl (1,15%) d'extrait avec déférent concentration solubilise dans méthanol, on a ajouté dans un tube à essai et constitue à 1 ml avec de l'eau distillée, suivi par l'addition de 1,5 ml d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 1,5 ml de 0,8% de 2-thiobabituric acide (TBA) à 1,1% de dodecylsulfate de sodium (SDS). Ce mélange a été agité dans un vortex, et chauffé à 95° C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, 5 ml de butanol a été ajouter à chaque tube, agité et centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 532 nm en utilisant un spectrophotomètre [121]. De l'eau distillée a été utilisée comme contrôle. L'effet d'inhibition sur la peroxydation, lipidique a été calculé comme suit [122] :

$$\text{Antioxydant index\%} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

A0 : étant la valeur d'absorbance du contrôle totalement oxydé

A1 : l'absorbance de l'échantillon à tester

II.3. Activité anti-oxydante

II.3.1. Piégeage du radical hydroxyle

La méthode de Piégeage du radical hydroxyle adoptée dans cette étude est celle de Zhong et al. (2010) ; avec peu modification. Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 1 ml de (9 mM FeSO₄) et 1 ml de 0.3% H₂O₂, 0.5ml de 9mM acide salicylique acid-éthanol solution, 1 ml de l'extrait à différentes concentrations. Après incubation de 60 min à 37 °C la lecture est effectuée à une longueur d'onde de 510 nm. L'effet scavenger du radical hydroxyle est calculé selon l'équation suivent [123] :

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

La concentration inhibitrice d'OH de l'extrait a été calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en mg/ml et comparée avec celle d'**acide ascorbique** [124].

II.3.2. DPPH (effet scavenger)

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de l'extrait [125]. Le DPPH est initialement violé, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité de l'extrait à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques [126]. Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (**figure15**) [126].

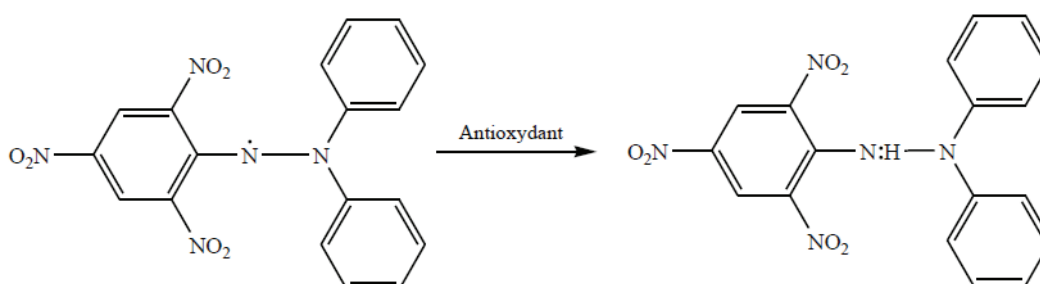


Figure 15 : Réduction du radical DPPH [126]

Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrés. Les résultats obtenus pour l'extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par l'extrait d' *Salvia Officinalis* a été calculé comme suit:

$$I \% = [(AC - AE) / AC] \times 100.$$

II.3.3. Reducing power

*Principe

Ce test repose sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur [127].

*Méthode de dosage

Le pouvoir a été déterminé selon la méthode de **Oyaizu (1986) [128]** ; avec quelques modifications dans la première étape, 2,5 ml d'une solution de phosphate buffer (0,2M- pH= 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium à 1% sont ajoutés à 2,5 ml des différentes concentrations des extraits. Après incubation de 20 minutes dans un bain marie à 50°C; on a ajouté 2,5 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% au milieu réactionnel. Après agitation et centrifugation à 3000 tours pendant 10 min, on a ajouté 1,25 ml de l'eau et 250µl de 0,1% $FeCl_3$ à 1,25 ml du surnageant. Vc a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en concentration IC50 qui se traduit par la concentration d'antioxydant utilise pour obtenir une absorbance de 0,5. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Les résultats sont comparés avec **l'acide ascorbique**.

II.4. Traitement des animaux

On a divisé les rats dans 4 groupes de 4 rats chacun et qui sont tous gardé dans les mêmes conditions. Pour le début du traitement soit par l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* à 200mg/kg la DOXO (15mg/kg) pendant 10 jours. Et les témoins qui reçoivent l'eau distillée dure 10 jours (durée de traitement)

II.5. Les groupes des animaux

Groupe 1 : control ou témoin {qui reçoivent quotidiennement par gavage gastrique 10ml/kg d'eau distillée pendant 10 jours}.

Groupe 2 : traiter par EBSO par gavage gastrique {ces rats reçoivent chacun une concentration de [200mg/kg/jr] d'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* pendant 10 jours}

Groupe 3 : traiter par extrait butanolique et injecter par la doxorubicine {ces rats reçoivent chaque jour EBSO avec une concentration de 200mg/kg pendant 10 jour et avant les deux derniers jours on injectait par la doxorubicine par la voie intra-péritonéale 15 ml/kg}

Groupe 4 : traiter par la doxorubicine {ces rats reçoivent chaque jour par gavage gastrique 10 ml/kg d'eau distille et une injection intra-péritonéale dans les deux derniers jours 15mg/kg}.

II.5.1. sacrifice des animaux et prélèvement d'échantillons biologiques

Le sang est prélevé au niveau de l'œil par ponction dans le sinus retro-orbital à l'aide d'un capillaire à bout poli et mis dans des tubes héparines pour prévenir la coagulation et réalisé les études biochimique et enzymatique (dosage de la CPK ,LDH ; ASAT , ALAT).

Puis, le sacrifice des animaux ainsi que le prélèvement des échantillons biologiques (cœur et foie) sont fait après l'injection de la doxorubicine.

II.6.Préparation de la fraction cytosolique de tissus 10%

Les fractions cytosolique est effectué selon la méthode de **Sanmugapriya et Venkataraman (2006) [129]**. Au moment du sacrifice les organes (cœur) sont récupérés, rince par l'eau physiologique salin 0.9%, ils sont pesés ensuite découpé en petits morceaux ; puis 1g d'organe est additionne à 9 ml (1v/10v) de solution tampon phosphate 0.1M PH 7.4 contenant du KCl 1.15% Et le mélange est homogénéise. L' homogénat est centrifugé à 4000 tours /minute pendant 10 minute à 4C° [129]. La fraction cytosolique est récupérée et utilisée pour les dosages du taux de malonaldéhyde (MDA), la concentration de glutathion réduit (GSH), et d'enzyme de la catalase (CAT).

II.6.1.Evaluation du MDA et du GSH cardiaque

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

***Principe**

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

Dans notre étude, le taux de MDA cardiaque a été évalué selon la méthode d'OHKAHAWA et al 1979. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100C°) entre de MDA et deux thiobarbiturique (TBA) d'un pigment colore absorbant à 530nm .extractible par les solvants organiques comme le butanol [130].

***Méthode de dosage**

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

II.6.2. Dosage du glutathion réduit cardiaque

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0.5 à 10 mM et de l'ordre du 4 M dans le plasma. Le glutathion se compose de trois amino acides (Figure 16) : l'acide glutamique, la cysteine, est l'acide amino essentiel à la synthèse du glutathion et la plus rare

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

***Principe**

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) et la méthode la plus employée [131] elle est basée sur l'oxydation du GSH par la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoique (TNB) lequel à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm.

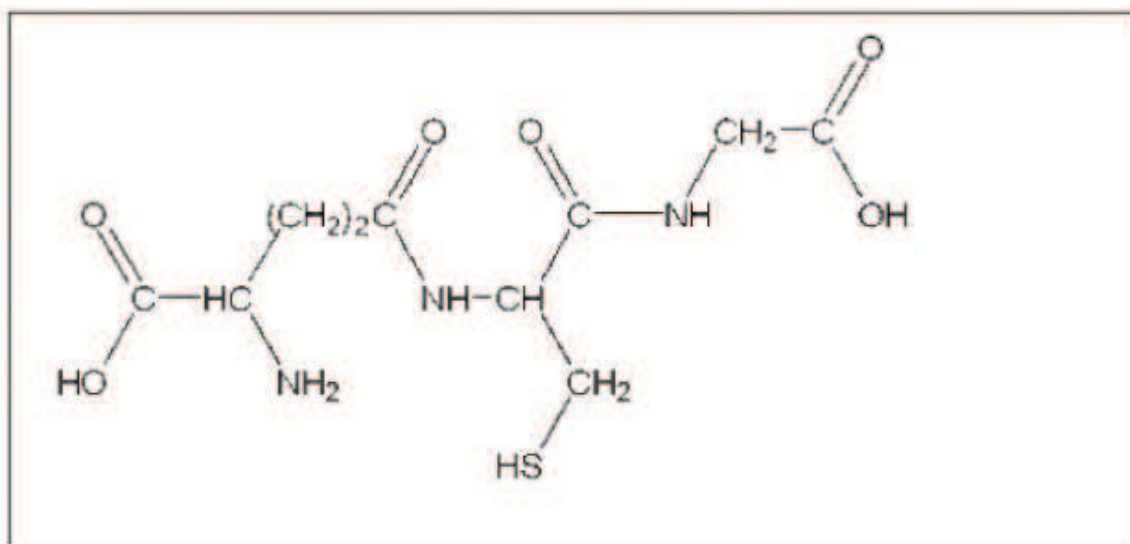


Figure16 : La formule chimique de la glutathion réduite

*Méthode de dosage

0.5ml d'acide trichloracétique (TCA10%) nous avons additionne à 0.5ml la fraction cytosolique 10% (KC11.15) du cœur, puis centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Ensuite à 1.7ml du tampon phosphate 0.1M, pH : 8, nous avons additionne 0.2ml de surnageant et 0.1ml du réactif d'Ellman 0.1M. La lecture de la densité optique est effectuée après ,5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec la TCA 10% les concentrations du GSH dans l'échantillon sont exprimées en $\mu\text{m/g}$ de tissu du cœur. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du GSH dans les mêmes conditions.

II.6.3. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique

L'activité de la catalase cytosolique, enzyme antioxydante est déterminée selon la méthode de **Clairborne 1985** [132].

*Principe

La catalase permet de catalyser la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) en eau et en dioxygène à 25° C par la présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique.

*Méthode de dosage

Le dosage est réalisé dans un volume final de 2.95ml à 3ml d'une solution d'oxyde d'hydrogène (H₂O₂) 19Mm (préparé dans tampon phosphate KH₂PO₄ 0.1M, pH7.4) nous avons additionné 50µl de la fraction cytosolique de l'échantillon. La réaction est contrôlée par une lecture continuée du changement d'absorbance à 240 nm après chaque minute dans intervalle de temps de 2 minutes.

*Calcul :

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

$$K = \frac{2.303}{T} \times \log \frac{A1}{A2}$$

K : constant de vitesse de la réaction

T : intervalle de temps

A1 : absorbance dans le temps zéro

A2 : absorbance après une minute

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

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

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

II.7. Dosage des paramètres biochimiques

Les activités enzymatiques de l'ASAT et de L'ALAT, biomarqueurs de la fonction cardiaque LDH et CPK, sont déterminées par colorimétrie en utilisant des Kits du commerce (SPINREACT) par **Analyseur chimique discret automatisé, Siemens, ADVIA 1800** au niveau de laboratoire de biochimie CHUC.

II.8. Préparation des échantillons des coupes histologiques

Pour l'étude histologique, des échantillons du cœur de tous les lots sont prélevés. Les organes doivent être rapidement prélevés notamment qui s'effectue après quelques instants de

la mort de l'animal. Après le rinçage des échantillons avec l'eau physiologique froide, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 10%

II.8.1. L'analyse histologique

Les techniques histologiques passent par plusieurs opérations qui s'enchaînent. La méthode qu'on a utilisée, avec inclusion à la paraffine comporte sept étapes principales :

- **Prélèvement** : des pièces dont les conditions sont déjà mentionnées.
- **La fixation** : réalisée dans le formol à 10 % qui se polymérise avec les polypeptides entraînant leur insolubilité.
- **Lavage, déshydratation et éclaircissement** : Le lavage est fait dans de l'eau courante, ensuite, on déshydrate les pièces en les amenant graduellement depuis le liquide de lavage jusqu'à l'alcool absolu par des bains successifs, puis on passe à l'éclaircissement en mettant les pièces dans un solvant de la paraffine qui est le xylène puis dans la paraffine.
- **L'inclusion** : Les pièces sont incluses dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures.

La paraffine va peu à peu pénétrer les tissus en remplaçant le solvant.

- **Construction des blocs** : Après la saturation des pièces par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive dans de petits moules à fond plat qui servent à donner la forme du bloc.

Ce dernier peut se conserver pendant des années sans dommage.

- **Préparation des coupes, étalement sur lame**: Le bloc de paraffine est collé au porte-objet puis débité en tranches minces grâce à un microtome. Les coupes sont collées sur des lames de verre. Ensuite, les lames sont séchées à l'étuve 37°C.

- **La coloration** : Les coupes sont colorées par la méthode H&E.

Les coupes sont observées au microscope optique à différents grossissements

II.9. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types.

L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test ANOVA. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :
 $p < 0,05$ = la différence est significative* ; $p < 0.01$ = la différence est hautement significative** ; $p < 0.001$ = la différence est très hautement significative***.
ns = la différence est non significatif par apport au groupe témoin.

Le calcul statistique est réalisé par SPSS 20.0

Partie III :
Résultats et discussion

I. Résultats

I.1. Screening phytochimique de l'extrait végétale

Les tests Phytochimiques réalisés sur EBSO révèle la présence de plusieurs familles de Composés dont résultats sont présentés dans le (Tableau 2).

Tableau 2 : Analyse Phytochimiques préliminaire d'extrait butanolique de *Salvia Officinalis*

Composés	EBSO
Tanins	+++ Apparition d'une coloration bleue noire et un précipite après 3min
Saponosides (tests 1 et 2)	+++
Composé réducteurs	+++ Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert.
Alcaloïdes sels	++ Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité)

Les résultats sont interprètes comme suit : (+) Réactions positives, (-) Réactions négatives
Les résultats obtenus lors du screening montrent que les feuilles contiennent le plus grand nombre de substances. Il est intéressant que l'EBSO, contienne en grande quantité les tanins, les saponines, les composés réducteurs, et les alcaloïdes faiblement présents. La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer leurs utilisation comme plante antioxydante.

I.2. peroxydation lipidique

Pour la détermination de pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique, nous avons utilisées deux tests « foie/ jaune d'œuf » et dans les deux tests on a utilisées deux différentes concentration de l'EBSO « 100 mg_ 200 mg »

Test 1

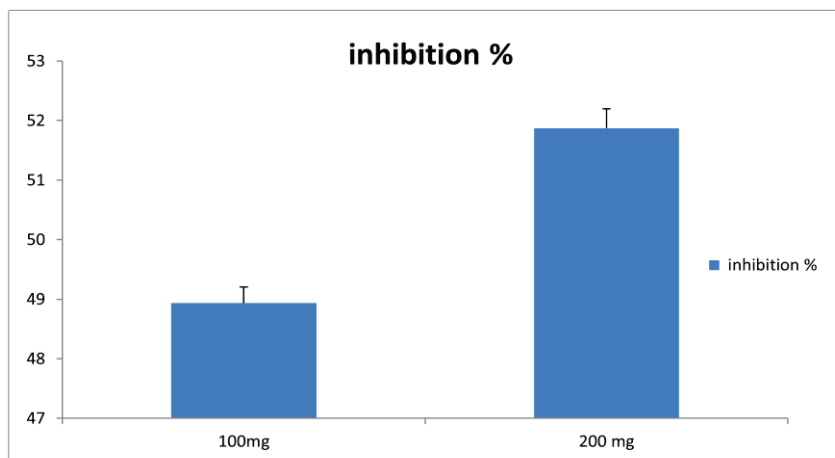


Figure17 : le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis*

Dans ce test, on a utilisées l'homogénat du foie comme une source riche en lipides. D'après les résultats nous avons remarquées une augmentation de pourcentage d'inhibition par l'EBSO à la concentration de 200 mg (0.488 ± 0.009) plus hautement significatif par rapport au pourcentage d'inhibition à la concentration de 100 mg (0.735 ± 0.15).

Test 2

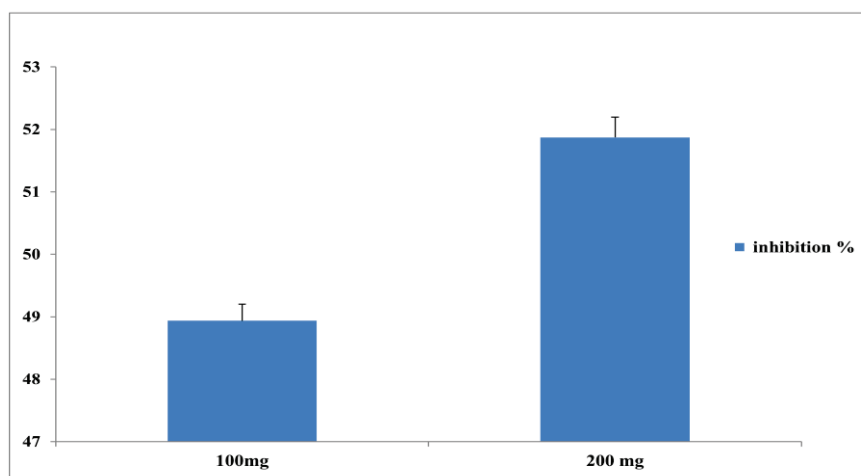


Figure18 : le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis*.

On a utilisées le jaune d'œuf comme une source riche en lipides. Selon nos résultats obtenus nous avons constaté une augmentation de pourcentage d'inhibition par l'EBSO à la concentration de 200 mg (0.836 ± 0.323) est plus hautement significatif par rapport au pourcentage d'inhibition à la concentration de 100 mg (0.887 ± 0.26) qui est presque la moitié de l'inhibition à la concentration de 200 mg.

I.3. l'activité antioxydante

I.3.1. Piégeage du radical hydroxyle

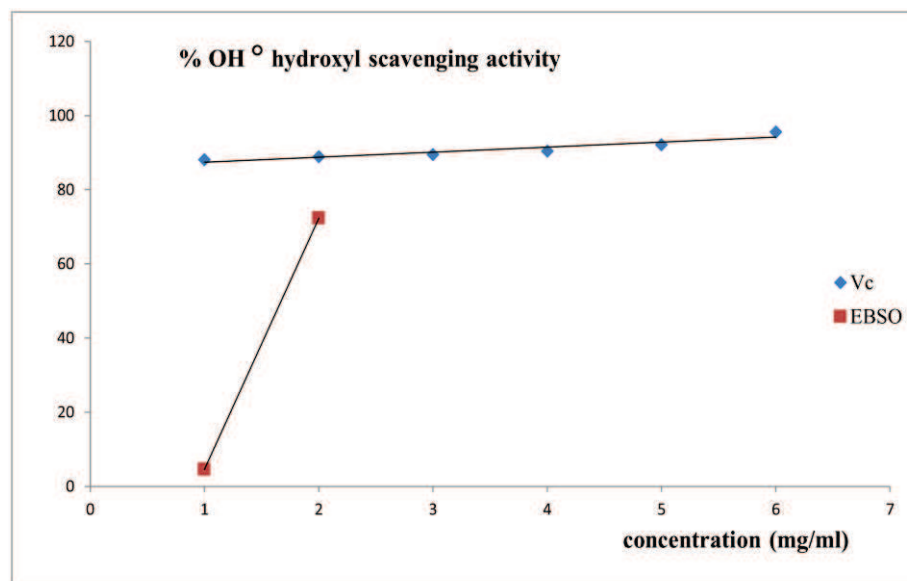


Figure19 : Piégeage du radical hydroxyle de extrait butanolique de *Salvia Officinalis* (EBSO) et Vc

Notre extrait EBSO étudié à la concentration 100 mg/ml a donné un piégeage de radical hydroxyle par un pourcentage (4,51%), et à la concentration de 200 mg / ml, comme la montre la **Figure 19** l'activité de piégeage du radical hydroxyle pour l'extrait EBSO et Vc était de et 72,31%, 88,15%, 88,91% respectivement. les activités de piégeage de l'extrait EBSO, et Vc augmente avec l'augmentation des concentrations. Ces résultats montrent que le Vc a une bonne activité de piégeage des radicaux hydroxyles par rapport à l'extrait butanolique. Selon ces études on peut signifier que notre plante *Salvia Officinalis* peut être considérée comme un bon piègeur de radicaux hydroxyles.

I.3.2. DPPH

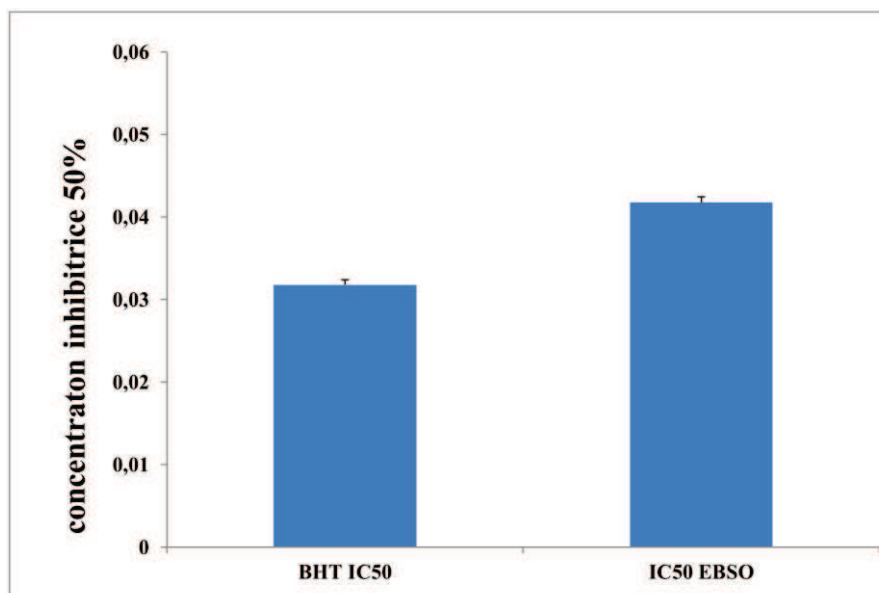


Figure20 : la concentration inhibitrice 50% de l'extrait butanolique *Salvia Officinalis* et de BHT qui inhibent 50% du radical DPPH.

IC50 est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Les valeurs inférieures d'IC50 indiquent l'efficacité de l'extrait et ainsi un pouvoir antioxydant plus fort. La capacité antiradicalaire de l'extrait butanolique *Salvia Officinalis* et de BHT est dose-dépendante.

On remarque d'après les résultats présentés dans la (**figure20**) les valeurs d'IC50 calculées sont les suivantes : BHT (IC50 = 0.0318 ± 0.0006), extrait butanolique (IC50 = 0.04175 ± 0.0007). Le pouvoir antioxydant de l'extrait vis à vis du radical DPPH est inférieur à celui qu'exerce le BHT. Ces résultats expliquent la propriété antioxydante des composés de l'EBSO.

I.3.3. Reducing power

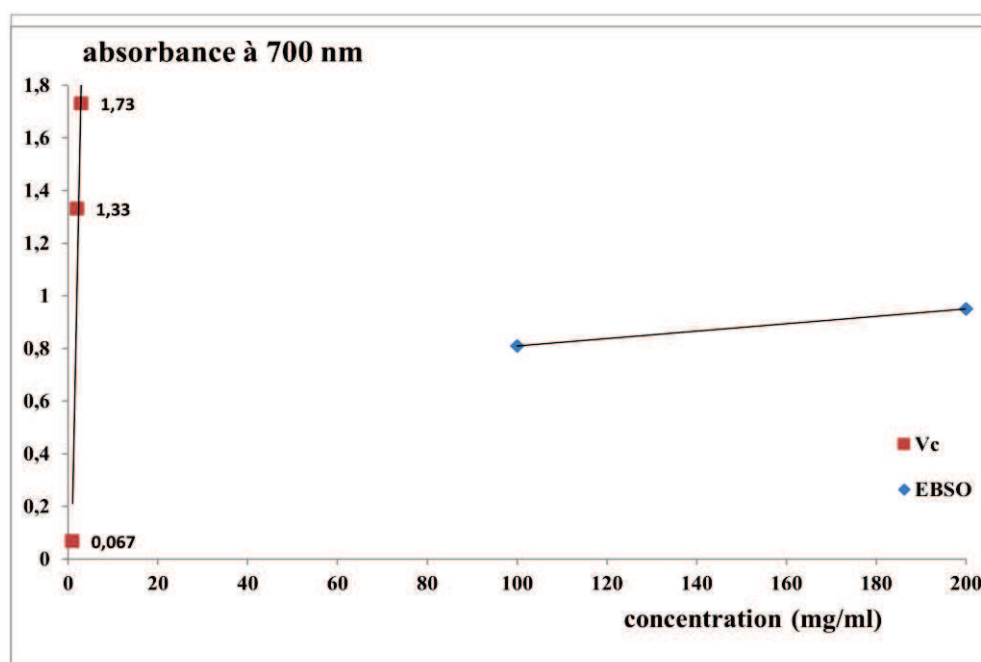


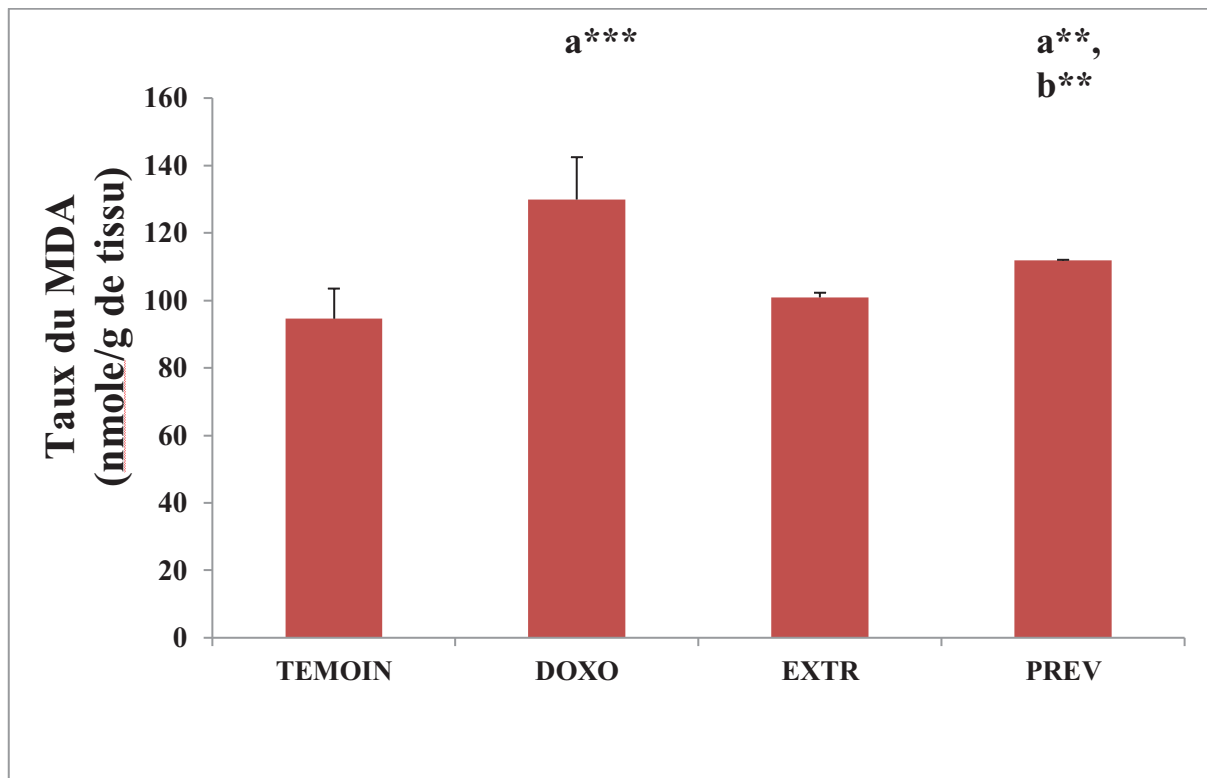
Figure21 : pouvoir réducteur de l'EBSO et VC

L'analyse du pouvoir réducteur consiste en la mesure de l'augmentation de l'absorbance des ions ferrique (Fe^{3+}) formé par l'oxydation des ions ferreux (Fe^{2+}). D'après les graphes de la figure, nous constatons que l'acide ascorbique qui est employé dans cette méthode comme un contrôle positif, a montré un pouvoir réducteur plus élevé que l'extrait a des différentes concentrations.

La VC a présenté le plus d'activité pour réduire le fer, alors que l'extrait a présenté un pouvoir réducteur inférieur par rapport aux VC (contrôle positif). Aussi, nous remarquons que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'extrait buthanolique *Salvia Officinalis*. De ce fait, nous pouvons dire que l'extrait buthanolique *Salvia Officinalis* possède une activité antioxydante intéressante.

I.4. Evaluation du MDA, GSH et CAT cardiaque

• MDA



Les résultats sont exprimés en moyenne ± écartype. Test ANOVA :

(a) Comparer avec le lot témoin ; (b) comparer avec le lot DOXO.

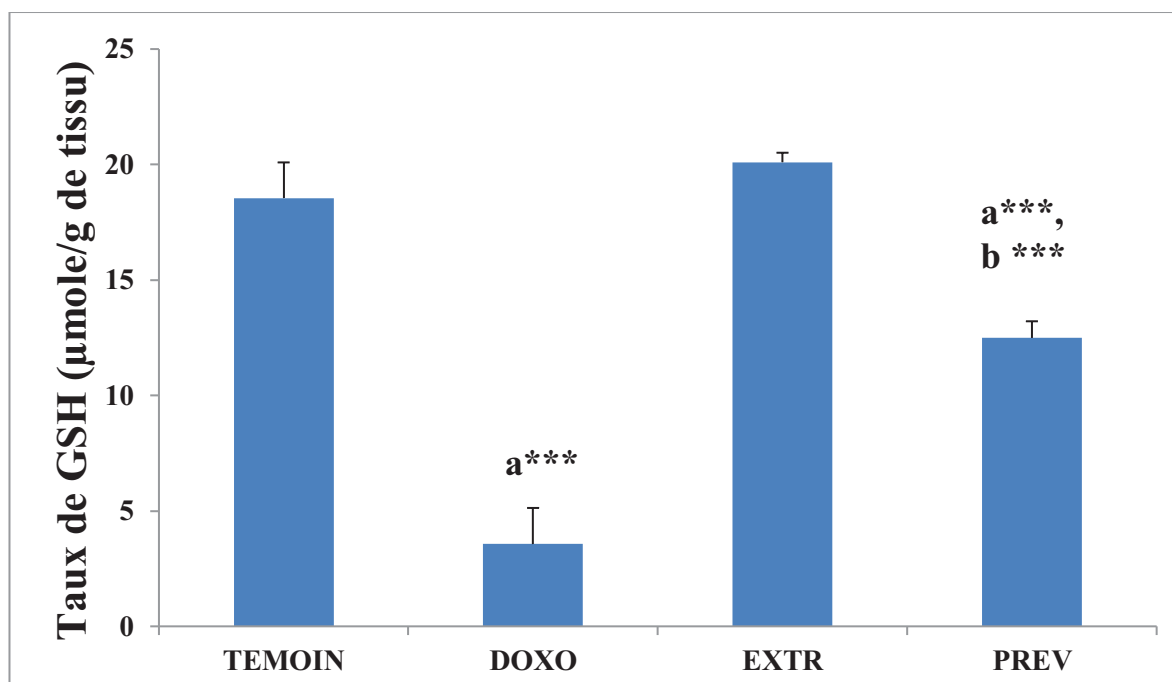
(*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet hautement significatif,

(***) désigne un effet très hautement significatif, (ns) non significatif.

Figure22 : variation des taux du MDA cytosolique chez les animaux traité par la Doxorubicine seules ou précédés par l'administration de l'EBSO.

Nous avons constaté une élévation très hautement significative du MDA chez les rats traitées par la doxorubicine (129.93 ± 12.54 nmol/g tissu) par rapport au groupe témoin (94.58 ± 8.93 nmol/g tissu). Par ailleurs, aucune variation significative du MDA n'est constatée chez les rats traités par l'extrait (100.90 ± 1.37 nmol/g tissu). Dans le groupe préventif (DOXO+ extrait) nous avons remarqués une augmentation hautement significative du MDA (111.95 ± 0.09 nmol/g tissu) comparé au groupe témoin (94.58 ± 8.93 nmol/g tissu).

- GSH



Les résultats sont exprimés en moyenne ± écartype. Test ANOVA :

(a) Comparer avec le lot témoin ; (b) comparer avec le lot DOXO.

(*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet hautement significatif,

(***) désigne un effet très hautement significatif, (ns) non significatif.

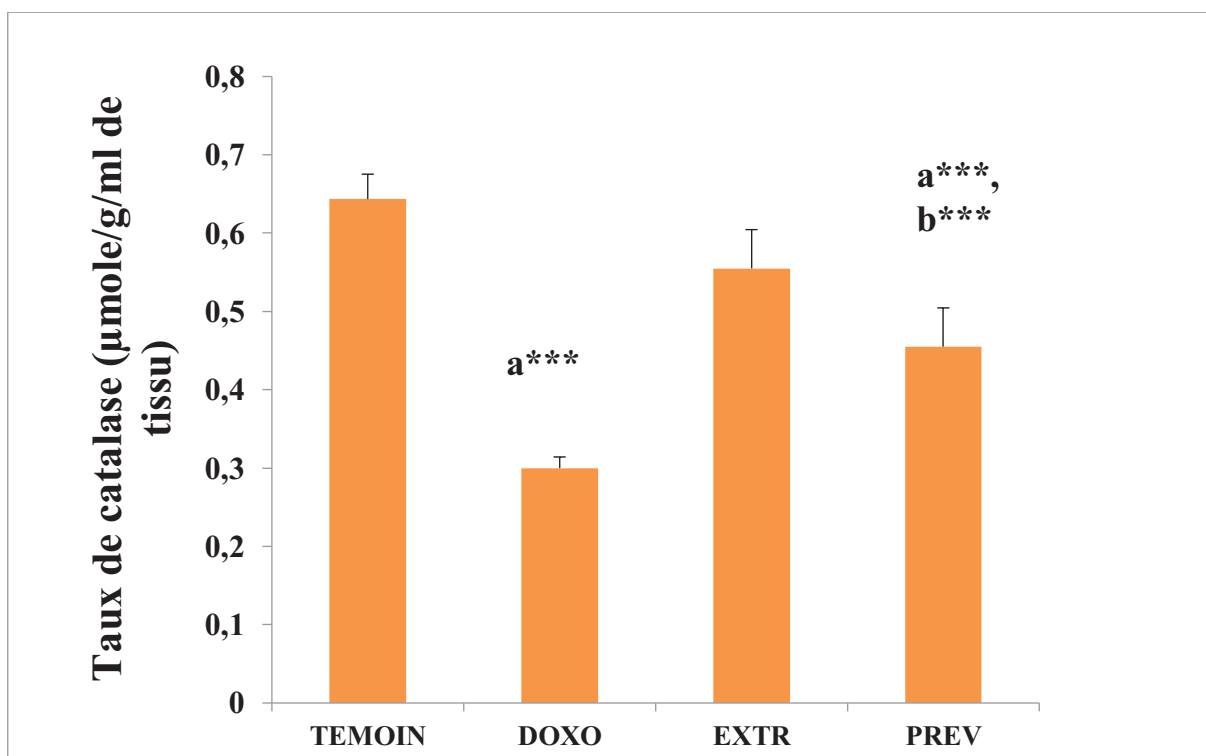
Figure23 : Effet de l'extrait butanolique de la plante salvia officinalis sur le niveau de GSH dans le cœur

Au niveau de la figure, Nous avons remarqué au niveau du cœur une diminution très hautement significative du GSH chez les rats traité par la DOXO (3.56 ± 1.56) par rapport au groupe témoin normal (18.55 ± 1.54). Et une diminution très hautement significative du GSH a été constatée chez les rats recevant la DOXO et prétraités par l'extrait butanolique

(12.49 ± 0.72) par rapport au groupe témoin normal (18.55 ± 1.54).

L'administration de l'extrait butanolique (12.49 ± 0.72) a augmenté très hautement significative le taux GSH dans le groupe préventif par rapport au groupe traité par la DOXO (3.56 ± 1.56).

- CAT



Les résultats sont exprimés en moyenne ± écartype. Test ANOVA :

(a) Comparer avec le lot témoin ; (b) comparer avec le lot DOXO.

(*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet hautement significatif,

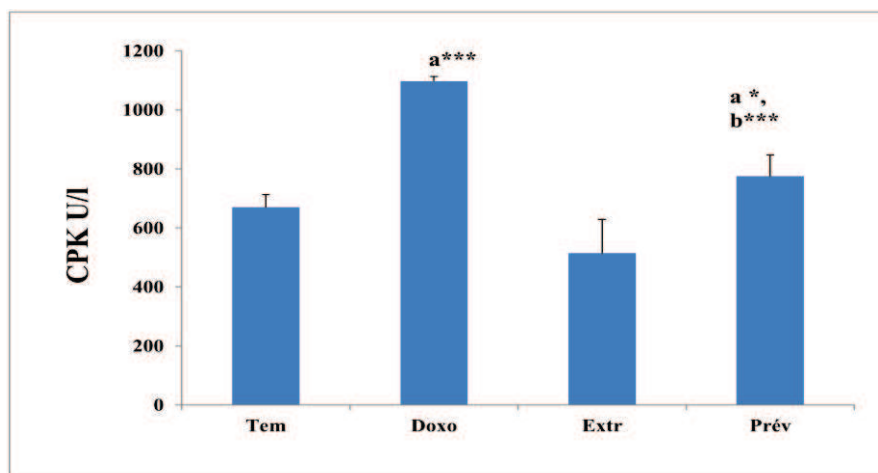
(***) désigne un effet très hautement significatif, (ns) non significatif.

Figure24 : Effet de l'extrait butanolique de la plante salvia officinalis sur le niveau de CAT dans le cœur

Dans notre étude, nous avons constaté une chute très hautement significative de l'activité de la catalase chez les rats recevant la XO (0.3 ± 0.014) par rapport au groupe témoin normal (0.64 ± 0.031). Par contre, nous avons remarqué une augmentation très hautement significative de l'activité de catalase chez le groupe préventif (0.45 ± 0.049) par rapport au groupe DOXO (0.3 ± 0.014). Et une augmentation très hautement significative par rapport au témoin (0.64 ± 0.031).

I.5. Les paramètres biochimiques

- CPK



Les résultats sont exprimés en moyenne ± écartype. Test ANOVA :

(a) Comparer avec le lot témoin ; (b) comparer avec le lot DOXO.

(*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet hautement significatif,

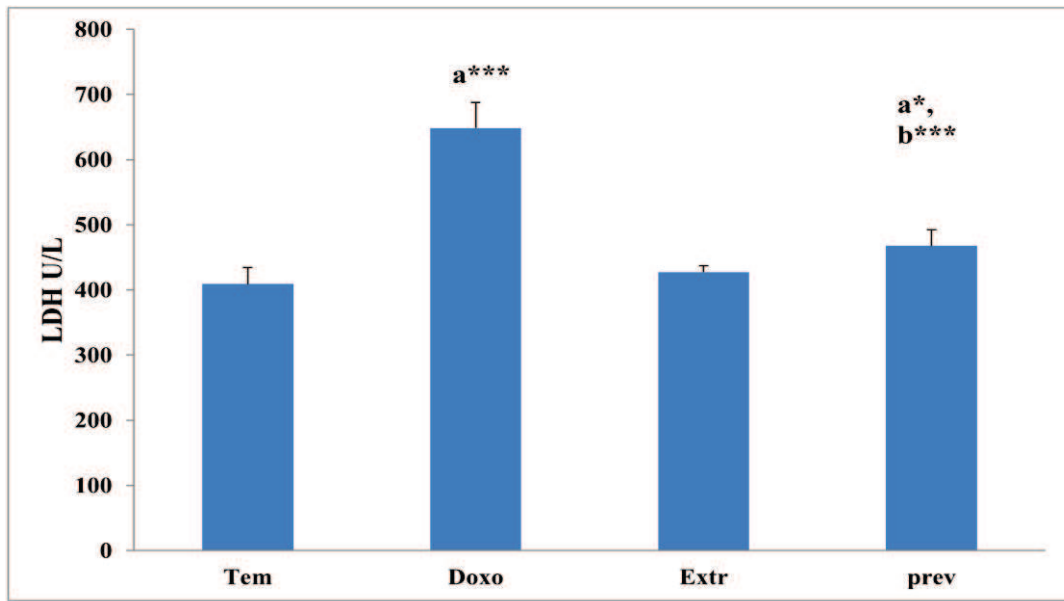
(***) désigne un effet très hautement significatif, (ns) non significatif.

Figure25 : Effet de l'extrait butanolique de la plante salvia officinalis sur le niveau du CPK dans le cœur

Nous avons constaté une élévation très hautement significative du CPK chez les rats traitées par la doxorubicine ($1097.46 \pm 15.28 \text{ UI/L}$) par rapport au groupe témoin ($669.54 \pm 42.54 \text{ UI/L}$).

Dans le groupe préventif il y a une augmentation significative du CPK ($775.30 \pm 72.32 \text{ UI/L}$) comparé au groupe témoin ($669.54 \pm 42.54 \text{ UI/L}$). Par ailleurs il y a une diminution très hautement significative du taux de CPK chez les rats du groupe préventif ($775.30 \pm 72.32 \text{ UI/L}$) comparé au groupe DOXO ($1097.46 \pm 15.28 \text{ UI/L}$).

• LDH



Les résultats sont exprimés en moyenne± ecartype. Test ANOVA :

(a) Comparer avec le lot témoin ; (b) comparer avec le lot DOXO.

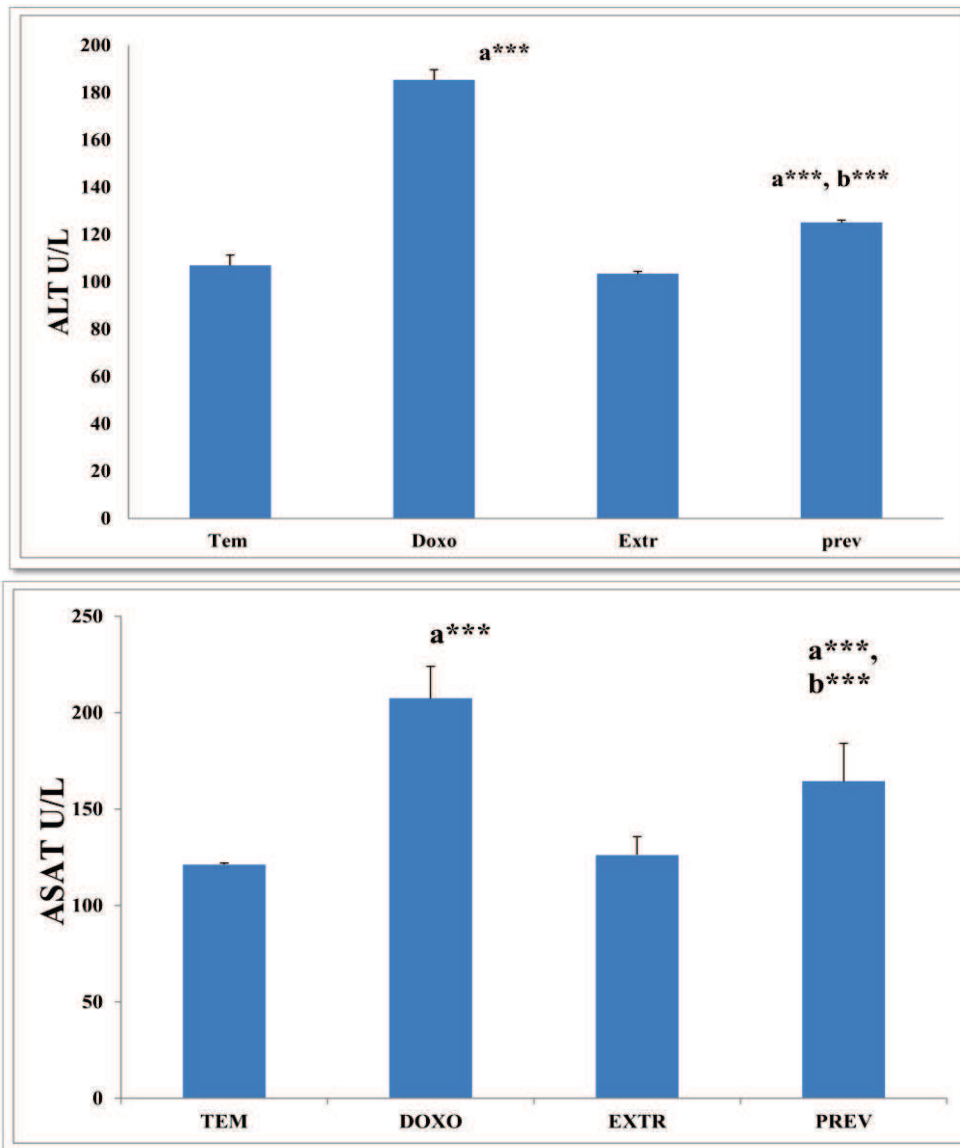
(*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet hautement significatif,

(***) désigne un effet très hautement significatif, (ns) non significatif.

Figure26 : Effet de l'extrait butanolique de la plante du salvia officinalis sur le niveau de LDH dans le cœur

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqués une augmentation très hautement significative du taux de libération du LDH chez le groupe DOXO (248.45 ± 39.12) par rapport au groupe témoin (409.30 ± 24.89). Par ailleurs, nous avons constaté une diminution très hautement significative du taux de libération du LDH de groupe Préventif (467.88 ± 24.79) par rapport au groupe DOXO (248.45 ± 39.12).

• ALT / ASAT



Les résultats sont exprimés en moyenne± ecartype. Test ANOVA :

(a) Comparer avec le lot témoin ; (b) comparer avec le lot DOXO.

(*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet hautement significatif,

(***) désigne un effet très hautement significatif, (ns) non significatif.

Figure 27 : Effet de la Doxorubicine et l'extrait butanolique de la plante *Salvia Officinalis* sur la fonction du cœur et sa libération des transaminases ALAT et ASAT

Nous avons remarqués une augmentation très hautement significative du taux d'ALAT (185,33±1,08) et ASAT (207,435±16,665) chez les rats du groupe traité par DOXO seulement par rapport au groupe témoin (106,9±4,29) et (121,27±0,73) successivement. Par contre chez le

groupe préventif, nous avons constaté une diminution très hautement significative du taux sérique d'ALAT ($125,015 \pm 3,03$) et d'ASAT. ($164,38 \pm 19,62$).

I.6. Analyse histologique

L'étude histologique du tissu myocardique a montré

Figure 28 : Les images A et B montrent deux coupes histologiques de rats du groupe témoin. Nous avons observés dans le tissu que les cellules montrent une organisation tissulaire normale sans la présence de cellules anormales ou de défauts structurels. La présence des fibres musculaires cardiaques intactes sont séparées par un tissu conjonctif remplissant l'espace intracellulaire (TC). Toutefois, chaque cellule reste bien individualisée, elle contient un noyau centré (N), allongé dans le sens de l'axe de la cellule.

Figure 29 : Chez les animaux traités par doxorubicine seule, les images A et B montrent une anomalie au niveau de la structure des cellules myocardiques, principalement par la présence d'une dystrophie musculaire (DS), et une lyse des fibres musculaires cardiaque (LFMC), et une apparition d'une nécrose.

Figure 30 : Les images A et B montrent deux coupes histologiques du tissu cardiaque chez des ayant reçu d'EBSO seul. On observe dans le tissu que les cellules montrent une organisation tissulaire normale sans la présence de cellules anormales ou de défauts structurels, pas de dommage du tissu cardiaque. Son image rassemble à celui du groupe témoin.

Figure 31 : L'étude histologique de biopsies endomyocardiques de tissu des rats du groupe préventif (prétraité par EBSO plus la DOXO). Les images A et B met en évidence la présence des artères et des fibres musculaire cardiaque intacte et marqué par une légère lyse (image C). En effet, il y a une correction par l'extrait EBSO qui a diminué remarquablement les lésions éminentes chez les rats traité par la DOXO seule.

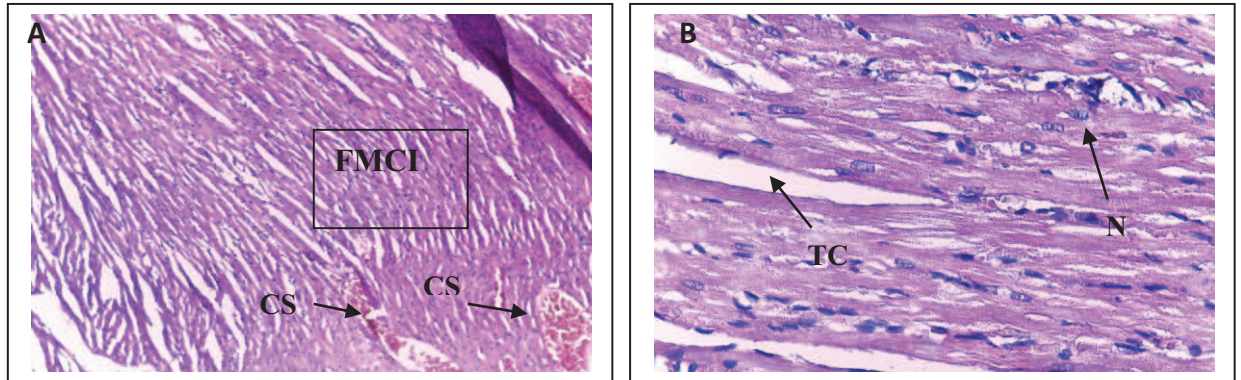


Figure 28 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe Témoin

Coloration hématoxyline éosine A (G×100) et B (G×400)

TC: Tissu conjonctif, FMCI : Fibre musculaire cardiaque intacte

N : Noyau de cardiomyocyte CS : Capillaires Sanguins

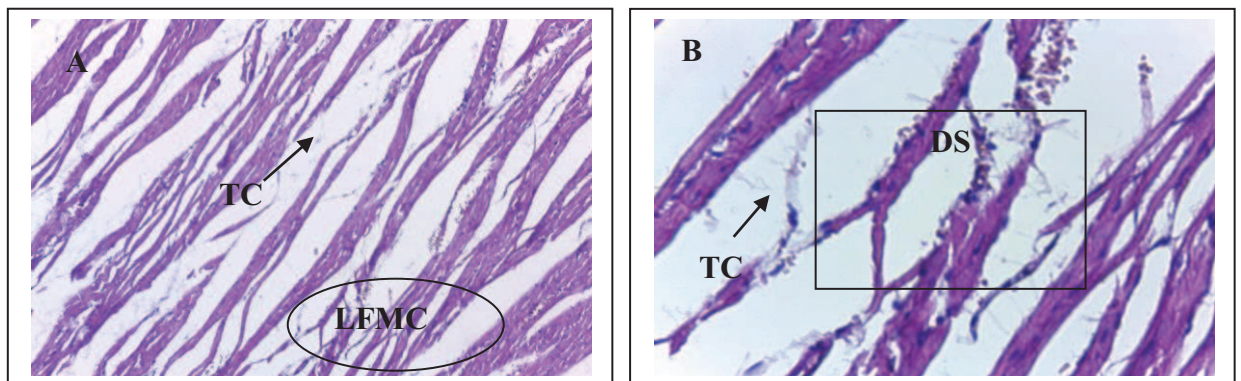


Figure 29 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe traité par la doxorubicine

Coloration hématoxyline éosine A (G×100) et B (G×400)

LFMC : Lyse des fibres musculaire cardiaque DS : Dystrophie Musculaire

TC: Tissu conjonctif

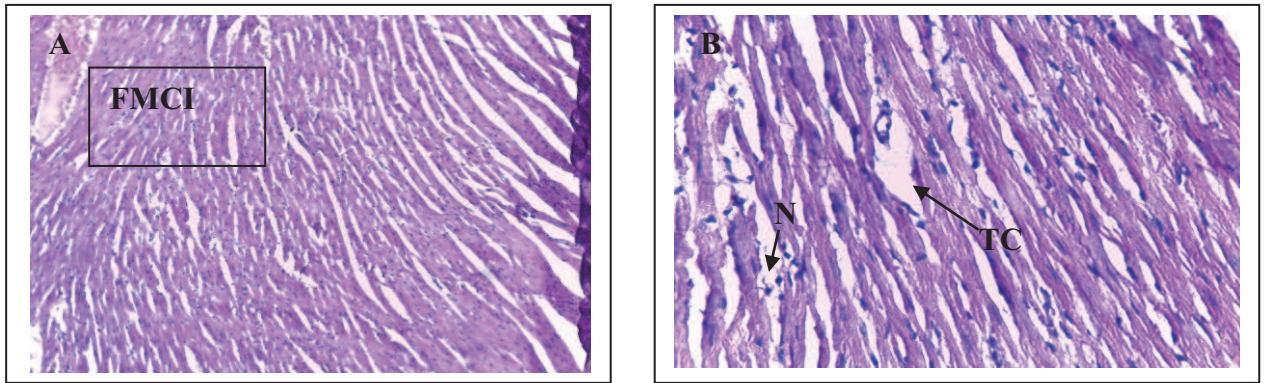


Figure 30: Coupes longitudinales du myocarde du groupe traité par l'EBSO

Coloration hématoxyline éosine A (G×100) et B (G×400)

TC: Tissu conjonctif, FMCI : Fibre musculaire cardiaque intacte

N : Noyau de cardiomyocyte

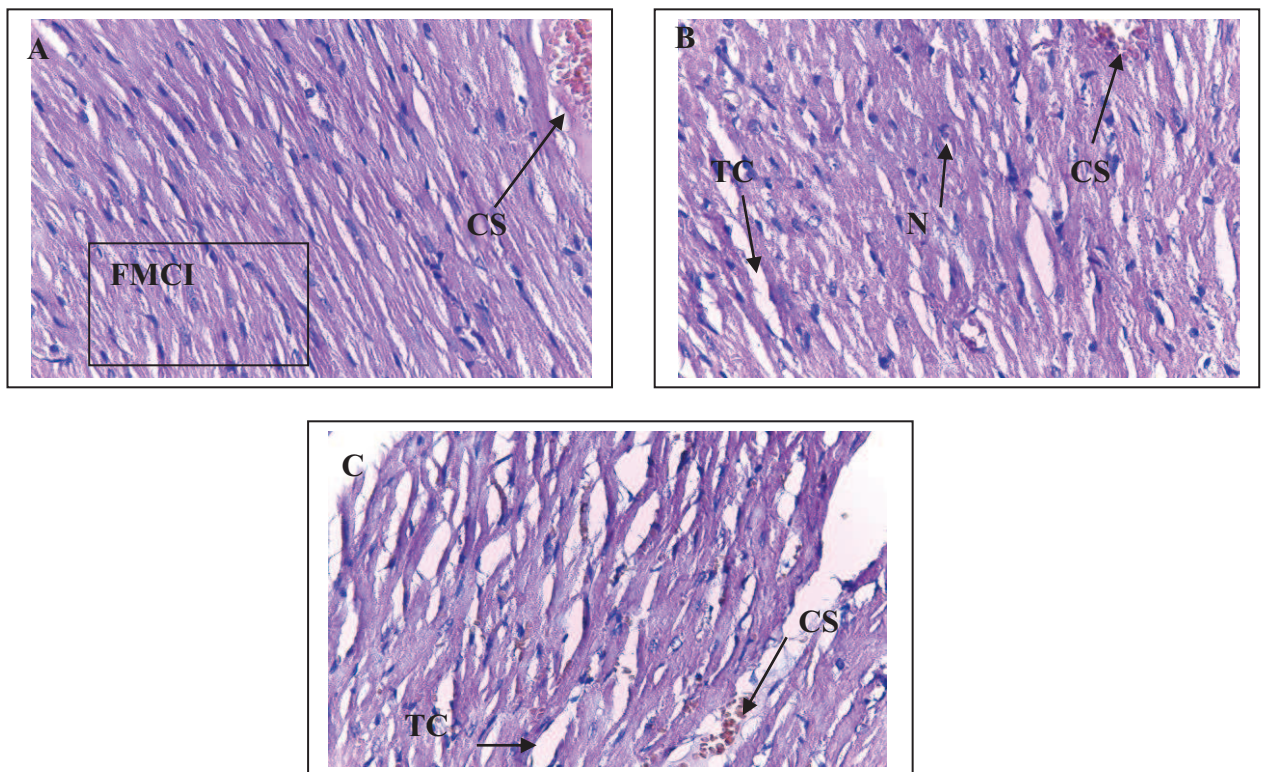


Figure 31: Coupes longitudinales du myocarde du groupe Préventif (DOXO + EBSO)

Coloration hématoxyline éosine A (G×100) , B (G×400) et C (G×400)

FMCI : Fibre Musculaire Cardiaque Intacte, N : Noyau de Cardiomyocyte

TC: Tissu Conjonctif, CS : Capillaires Sanguins

II. Discussion

La doxorubicine est reconnue comme l'un des médicaments actifs pour le cancer, mais son utilité clinique est limitée en raison d'une dose cardiaque cumulative [133].

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer la cardiotoxicité de la doxorubicine, mais il apparaît que l'induction d'un stress oxydatif au sein du tissu myocardique constitue le dénominateur commun de ces mécanismes par la production des radicaux libres [134].

La prévention de cette cardiotoxicité repose sur une surveillance cardiaque étroite. Dans le contexte de la protection myocardique, l'emploi d'agents cardioprotecteurs couplés à la chimiothérapie, tels que des composés pharmacologiques agissant sur le niveau du stress oxydatif fait actuellement l'objet de recherches intensives en vue d'une utilisation optimale des anthracyclines.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale très répandue dans le bassin méditerranéen et très utilisée pour ses innombrables vertus thérapeutiques. Il s'agit de *Salvia Officinalis* L. (Lamiacées) ou Sauge officinale. L'objectif était de vérifier la spécificité de cette espèce végétale sur le plan cardioprotecteur et notamment l'activité antioxydante.

Dans un premier temps, nous avons fait un screening phytochimique de l'extrait butanolique de la plante *Salvia Officinalis* (EBSO).

Les différents tests qu'on a réalisés montrent que les feuilles contiennent le plus grand nombre de substances comme les tanins, les saponines (saponosides), les composés réducteurs, et les alcaloïdes.

L'activité antioxydante d'extrait de la plante a été testée en utilisant plusieurs tests in vitro avant de passer à l'étude in vivo [136]. Pour cela, on a commencé par les 2 tests de peroxydation lipidique pour la détermination de pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique, nous avons utilisés deux tests « foie/ jaune d'œuf ». D'après les résultats, nous avons trouvé que l'EBSO à la concentration de 200 mg a un effet inhibiteur plus puissant qu'à la concentration de 100 mg. Ces résultats sont relativement en accord avec les études de **Bounatirou et al, 2007** qui ont montré que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique varie d'une plante médicinale à une autre et avec des concentrations élevées [122].

Puis, Piégeage du radical hydroxyle d'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* (EBSO) et Vc.

Le radical hydroxyle est le plus connu par sa réactivité, sur les bio-macromolécule des cellules vivantes et ces dommages biologiques caractérisés par sa capacité à stimuler la peroxydation des lipides, qui se produisent lors de l'attaque des phospholipides membranaires [135]. Notre extrait (EBSO) à la concentration de 200mg/ml l'EBSO a montré une plus grande activité de piégeage des radicaux hydroxyles [137, 35, 138]. Selon ces études on peut démontrer que notre plante peut être considérée comme un bon piègeur de radical hydroxyle.

Ensuite, le test de DPPH effectué sur l'EBSO pour évaluer son effet scavenger a montré qu'il a une IC50 proche de BHT. Par comparaison aux autres études [139, 140]. On peut dire que l'EBSO a un effet scavenger important. La capacité antioxydante des plantes est principalement due à leur richesse en composés phénoliques, qui sont capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique [141].

La présence et le nombre de groupements OH libres sont des facteurs déterminants de l'activité antioxydante des polyphénols [142].

Comme nous avons aussi évalué l'activité antioxydante de l'extrait par la technique reducing power qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant de la plante. Ce test est basé principalement sur la présence de réducteurs (comme antioxydants) provoque la conversion du complexe Fe³⁺ ferricyanure à la forme ferreuse Fe²⁺. Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène pour la respiration et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et les cellules [143].

D'après les résultats l'EBSO possède un pouvoir réducteur inférieur à celle du VC. Les résultats de ce travail sont relativement en accord avec d'autres études qui ont montré que le pouvoir réducteur varie d'une plante médicinale à une autre [144, 145].

D'après ces résultats in vitro, nous pouvons dire que : L'extrait donne une bonne activité antioxydante soit une capacité de piégeage des radicaux libres et la réduction de fer est un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un puissant pouvoir réducteur. Nous a encouragés à évaluer cette dernière in vivo sur les rats comme deuxième étape. En

effet, des analyses portant l'évaluation du statut oxydatif au sien du tissu cardiaque ont été réalisées.

Tout d'abord, nous avons commencés par les biomarqueurs CPK, LDH, ALT et AST étaient Significativement élevé 72 h après l'injection de DOXO par rapport à des niveaux dans les rats témoins .L'administration de la doxorubicine a provoqué une augmentation des marqueurs biochimique de la fonction du cœur par induction du stress oxydant qui provoque des lésions cardiaques comme l'infarctus cardiaque [146].

Même les cellules nécrosées déversent leurs contenus cytosolique qui conduit à la fuite des enzymes des cellules, donc à la diminution des taux d'ALT et d'AST à l'intérieure des cellules et à l'augmentation de ces taux dans le sérum. La mesure de l'activité enzymatique (CPK, LDH et les transaminases) peut être un indicateur de lésions cardiaque [147].

Dans notre étude, les résultats ont montré des augmentations significatives chez le groupe traité par la DOXO seule confirme l'atteinte cardiaque par ce médicament. Par contre, dans le groupe préventif on a constaté une diminution significative des taux sérique ASAT et ALAT bien que le prétraitement par l'extrait butanolique (EBSO) a temporisé l'effet de la DOXO et a normalisé les taux des biomarqueurs biochimiques et il a permet de rétablir les activités normales de ces enzymes. Cela est en accord avec ceux obtenus dans l'étude d'Andreadou et al qui a induit une cardiotoxicité avec la dose 20 mg /kg [148, 149].

Ainsi que, Le prétraitement des rats par l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* a diminué le taux de CPK et LDH. Ceci ne peut être expliqué que par le fait de la plante a assuré la protection de l'intégrité cellulaire cardiaque contre les lésions provoquées par la doxorubicine. Nos résultats corroborent avec d'autres études [150, 151, 152].

En outre, D'après nos résultats, l'augmentation du taux de MDA est significative concernant les rats traités par une seule dose du doxorubicine. Ce qui induit l'élévation de la peroxydation lipidique, et après l'administration précoce de l'EBSO nous avons enregistré une diminution significative du taux de MDA, ces résultats prouvés l'effet préventif de l'extrait sur la peroxydation lipidiques par sa propriété anti radicalaire et captation des radicaux libres des autres études sont en accord avec nos résultats [153, 154].

Le glutathion réduit (GSH) joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydant [155]. La déplétion du GSH cardiaque est souvent associée à la cardiotoxicité de

la DOXO [156]. Cela est en bon accord avec les résultats de notre étude dans laquelle on a observé que les résultats ont révélé une chute significative du GSH cardiaque chez les animaux traités par la doxorubicine. Cette baisse est certainement due à l'action toxique des métabolites toxiques réactifs de la DOXO qui sont neutralisés par le GSH provoquant son diminution [157, 158].

Par contre, l'administration de l'extrait butanolique EBSO a augmenté le taux du glutathion réduit (GSH) dans le groupe préventif par rapport au lot groupe traité par la DOXO. Cet effet démontre le pouvoir protecteur antiradicalaire de l'extrait qui est donc capable d'empêcher la chute du GSH et stimulant sa régénération à . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de l'activité cardioprotecteur [158].

D'après notre étude, l'administration de la DOXO seule provoque une chute significative de l'activité de la catalase cytosolique cardiaque ce constat peut être due à une augmentation massive de H₂O₂ ce qui augmente le stress oxydant au niveau cardiaque. Par contre une augmentation significative a été remarquée chez les rats du groupe prétraité par l'EBSO. Cette augmentation de l'activité de la catalase, indique le pouvoir protecteur antiradicalaire de l'extrait, cela a été décrit auparavant par plusieurs études [159, 160, 154].

Les différentes analyses histopathologiques ont été effectuées afin de confirmer si l'administration de la doxorubicine en une dose 15 mg/kg unique a induit les différents changements normalement observés lors du développement d'une cardiotoxicité et si l'extrait apparaisse être un agent protecteur efficace contre la cardiomyopathie.

Chez les rats du groupe DOXO nous avons remarqué des dommages tissulaires, principalement par la présence d'une dystrophie musculaire (DS), et une lyse des fibres musculaires cardiaques (LFMC). Ces dommages morphologiques montrent une anomalie au niveau de la structure des cellules myocardiques. Par contre le lot prétraité par l'EBSO qui a diminué remarquablement les lésions éminentes chez les rats traités par la DOXO seule.

Le prétraitement protège de manière significative Le myocarde issu de la toxicité induite par la DOXO ceci est confirmée par plusieurs travaux [161,162].

Conclusion

Conclusion

Notre travail est proposé afin d'étudier l'effet préventif de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* (EBSO) contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine.

D'après nos résultats nous avons prouvés que la DOXO a provoqué une cardiotoxicité aigue chez des rats mâles par injection intrapéritonéal à une dose de 15 mg/kg.

Les résultats in vitro ont montré que l'extrait possède une activité antioxydante remarquable, soit une capacité de piégeage de radicaux libres et la réduction de fer et un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique.

En outre, les résultats in vivo des dosages biochimiques et l'évaluation du MDA, GSH, CAT ont confirmé le pouvoir protecteur anti radicalaire de l'extrait en minimisant les conséquences du stress oxydant sur le plan biochimique par diminution des activités enzymatique de la CPK ,LDH, et les transaminases et la diminution du taux MDA. Ainsi que, l'augmentation du niveau des enzymes antioxydants GSH et catalase. Aussi, les différentes analyses histopathologiques ont confirmé que le prétraitement par l'EBSO protège de manière significative le myocarde issu de la toxicité induite par la DOXO.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux a permis de souligner les effets antioxydants et cardioprotecteurs de l'administration de l'extrait butanolique de *salvia officinalis* (EBSO) (200mg/kg), par son pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène, il possède une activité antioxydante contre la toxicité induite par la Doxorubicine, ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante.

Résumé

Résumé

L'utilisation de l'agent antitumorale doxorubicine est limitée par sa cardiotoxicité, dans le quel leur mécanisme principale est l'induction du stress oxydatif.

La présente étude visait à évaluer le stress oxydatif induit par la doxorubicine dans le cœur et étudier l'effet antioxydant et cardioprotecteur de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* par différentes méthodes.

La toxicité cardiaque aigüe de la DOXO a été évaluée chez des rats mâles par injection intrapéritonéal à une dose de 15 mg/kg, après le traitement précédant de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* pendant 10 jours par voie orale : Par des dosages biochimiques, évaluation du MDA, GSH, CAT, et des coupes histologiques.

D'après les résultats; il apparaît que l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* protège le cœur contre la toxicité aigüe de la doxorubicine en augmentant le niveau des enzymes antioxydants GSH, catalase et l'inhibition de la peroxydation lipidique ce qui empêche la libération des transaminases cardiaque et CPK dans le sang, ces résultats ont été confirmés par les études histologiques.

Ces résultats indiquent clairement que l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* joue un rôle protecteur important vis-à-vis la cardiotoxicité provoquée par la doxorubicine.

Mots clés : *Salvia Officinalis*, la doxorubicine, la cardiotoxicité, stresse oxydative.

Abstract

The use of the antitumor agent doxorubicin is limited by its cardiotoxicity, in the case of its main mechanism is the induction of oxidative stress.

The objective of this study was to evaluate the oxidative stress induced by doxorubicin in the heart and to study the antioxidant and cardioprotective effect of the butanol extract of *Salvia Officinalis* By different methods.

Acute cardiac toxicity of DOXO was evaluated in male rats by intraperitoneal injection at a dose of 15 mg / kg, after the previous treatment with butanol extract of *Salvia Officinalis* for 10 days orally. By biochemical assays, evaluation of MDA, GSH, CAT, and histological sections.

According to the results; It appears that the butanol extract of *Salvia Officinalis* protects the heart against the acute toxicity of doxorubicin by increasing the level of antioxidant enzymes GSH and catalase and the inhibition of lipid peroxidation which prevents the release of cardiac transaminases and CPK in These results have been confirmed by histological studies.

These results clearly indicate that the butanol extract of *Salvia Officinalis*. Plays an important protective role in the cardiotoxicity caused by doxorubicin.

Keywords: *Salvia Officinalis*, doxorubicin, cardiotoxicity, oxidative stress.

الملخص

إن استخدام doxorubicine كعلاج مضاد للورم أصبح محدود بسبب السمية القلبية الناتجة عنه، التي أليتها الرئيسية هي توليد الجهد التأكسدي.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم الجهد التأكسدي الناتج عن doxorubicine في القلب وفحص الفعل المضاد للأكسدة و الواقى للقلب للمستخلص البيتانولي لـ *Salvia Officinalis* بطرق مختلفة.

تم تقييم السمية الحادة للقلب من DOXO في ذكور الجرذان عن طريق الحقن تحت الصفاق بجرعة (15ملغ / كغ)، بعد إعطاء الجرذان للمستخلص البيتانولي لـ *Salvia Sfficinalis* مسبقاً لمدة 10 أيام عن طريق الفم. عن طريق فحوصات كيميوية، وتقييم كل من MDA، GSH، CAT، بالإضافة إلى المقاطع النسيجية.

وفقاً للنتائج يبدو أن المستخلص البيتانولي لـ *Salvia Officinalis* قد قام بحماية القلب ضد السمية الحادة لـ doxorubicine عن طريق زيادة مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة catalase و GSH، وتثبيط فوق الأكسدة الليبية و هو ما يمنع تسرب كل من transaminases و CPK في الدم و هذا ما أكدته نتائج الدراسات النسيجية.

هذه النتائج تشير بوضوح إلى أن المستخلص البيتانولي لـ *Salvia Officinalis* يلعب دور هام في حماية القلب من السمية الناتجة عن doxorubicine .

الكلمات الرئيسية: سالفيا أوفسيناليس، دوكسوروبيسين، السمية القلبية، الجهد التأكسدي.

*Références
bibliographiques*

- [1] Sheela A. Abraham, Dawn N. Waterhouse, Lawrence D. Mayer, Pieter R. Cullis, Thomas D. Madden, and Marcel B. Bally. (2005). The Liposomal Formulation of Doxorubicin. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 391, 72-97.
- [2] Chatterjee. K, Zhang. J, Honbo. N, Karliner. JS. (2010). Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology*, 115(2), 155-62.
- [3] Chahine. N. (2014). Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique. *Thèse de Doctorat de Reims Champagne-Ardenne*.
- [4] Minotti. G, Menna. P, Salvatorelli. E, Cairo. G, Gianni. L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol*, 56, 185–229.
- [5] Singal. P.K, I. N. (1997). Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J*, 11, 931–936.
- [6] Andrieu-Abadie. N, Levade. T, Laurent. G, Hatem. S, Mercadier. J-J . (1999). Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine. *médecine/sciences*, 15, 1322-1324.
- [7] Waugh. A, Grant. A, Cosserat. J, Ross et Wilson. (2015). *Anatomie et physiologie normales et pathologiques* (éd. 12e édition). (E. Masson, Éd.) Issy-les-Moulineaux.
- [8] Costentin. J, Défossez. A, Fellmann. D. (2008). *Histologie bases fondamentales*.
- [9] Cummings. J, W. N. (1991). The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer*, 27.
- [10] lauralee sherwood. 2006. *physiologie humain*. 2e. Boeck Université. p. 245.
- [11] CHUM (2007, NOVEMBRE). *Système cardiaque / Anatomie-physiologie cardiaque*. Direction des soins infirmiers, 1- 57
- [12] Olivetti. G, Giordano. G, Corradi. D, Melissari. M, Lagrasta. C, Gambert. SR, et al. (1995, Oct). Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*, 26(4), 1068–1079.

- [13] **Tortora. GJ, Grabowski. SR. (1994).** *Principes d'anatomie et de physiologie.* Boeck Université.
- [14] **Porter. KE, Turner. NA. (2009, Aug).** Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther, 123(2), 255–78.*
- [15] **Richardson. P, McKenna. W, Bristow. M, Maisch. B, Mautner. B, O'Connell. J.(1995).** Report of the 1995 World Health Organization. *International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies Circulat.*
- [16] **Donatiello. C.(2002).** La toxicité cardiaque des anthracyclines dans le traitement des tumeurs de l'enfant. Thèse de doctorat : Univ. Genève
- [17] **Pein. F, Vassal. G, Sakiroglu. C, Tournade. MF, Lemerle. J. (1995).** Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques, 2(10), 988-999.*
- [18] **Roben.J. (1992).** Pharmacologie de la doxorubicine et de ses dérivés. *Cancerologie Aujourd'hui, 27-35.*
- [19] **Grenier. MA, Lipshultz. SE. (1998).** Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol, 25, 72–85.*
- [20] **Lipshultz.SE, Alvarez. JA, Scully. RE. (2008).** Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart Br Card Soc, 94, 525–33.*
- [21] **Weiss. R . (1992).** The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? . *Semin Oncol, 19-26.*
- [22] **Barry. E, Alvarez. JA, Scully. RE, Miller. TL, Lipshultz. SE. (2007).** Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert Opin Pharmacother, 8, 1039–58.*
- [23] **Bouma. J., Beijnen.J. H., Bult.A., and Underberg. W. J. (1986).** Anthracycline antitumour agents. A review of physicochemical, analytical and stability properties. *Pharm. Weekbl.Sc, 8, 109.*

- [24] DOXORUBICIN (chlorhydrate de doxorubicine) – Renseignements pour le consommateur. (2014). 44_48.
- [25] Mross. K, Mayer. U, Hamm. K, Burk. K, Hossfeld. DK . (1990). Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans. *EurJ Clin Pharmacol*, 39, 507- 513.
- [26] Doxorubicine Monograph, Drugdex. Thomson Reuters. (2016).(http://thomsonhc.com).
- [27] Zhou. Q, C. B. (2002).Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bileby LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *ournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1063-1074.
- [28] Tannock, Ian, Richard P, Hill. (1998). The basic science of oncology. *McGraw-Hill Health Professions Division*, 539 p.
- [29] Cutts.S. M, et Phillips.D. R. (1995).«Use of oligonucleotides to define the site of interstrand cross-links induced by Adriamycin». *Nucleic Acids Res*, 23(13), 2450_2456.
- [30] Vejpongsa. P, YehETH. (2014, Sep 2). Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity:challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*, 64(9), 938–45.
- [31] Phillips et al. (1996). Adriamycin-induced DNA Adducts Inhibit the DNA Interactions of Transcription Factors and RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 5422- 5429.
- [32] Outomuro. D, Grana. DR, Azzato. F, Milei. J. (2007). Adriamycin-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem. *International journal o cardiology*, 117, 6-15.
- [33] Andrieu-Abadie. N, Levade. T, Laurent. G, Hatem. S, Mercadier. J . (1999). Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicin? *Médecine/sciences*, 15, 1322-4.
- [34] Hames. BD, Hooper. NM, Houghton. JD . (1999). L'essentiel en biochimie. *Berti édts*, 155-160.

- [35] **Minotti. G, Menna. P, Salvatorelli. E, Cairo. G, Gianni. L. (2004).** Anthracyclines:molecular advances and pharmacologic developments in antitumor, activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56, 185-229.
- [36] **Iarussi et al. (2001).** the Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood Current Medicinal Chemistry. *Recent Advances*, 8(13), 1649-1660(12).
- [37] **Walker. R, Milford. D, Dersyshire. P. (1992).** Bradycardia after amphotericin, irradiation and anthracycline. *Lancet*, II, 380.
- [38] **Yeung. ST, Yoong. C, Spink. J, Galbraith. A, Smith. PJ. (1991).** Functional myocardial impairment in children treated with anthracyclines forcancer. *Lancet*, 337, 816-818.
- [39] **Bricker. JT, Green. DM, D'Angio. G. (1993).** Cardiac toxicity after treatment for childhood cancer. *Wiley-Liss Inc.*
- [40] **Raber. SR, Rushing. DA, Rodfold. KA, Piscitelli. SC, Plank. GS, Tewkbury. DA. (1994).** Effects of cyclosporin (CSA) on the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PF) of doxorubicin (DOX). *Clin Pharmacol Ther*, 189.
- [41] **S. Delemasure a, C. V. (2006).** Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. *From basic concepts to clinical data*, 104–112.
- [42] **Corbett. KD, Berger. JM. (2004).** Structure molecular mechanisms and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33, 95–118.
- [43] **Nitiss. JL. (2009, May).** Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 338–50.
- [44] **Harkins. TT, Lewis. TJ, Lindsley. JE. (1998, May 19).** Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry (Mosc)*, 37(20), 7299–312.
- [45] **Moro. S, Beretta. GL, Dal Ben. D, Nitiss. J, Palumbo. M, Capranico. G. (2004, Jun 15).** Interaction model for anthracycline activity against DNA topoisomerase II. *Biochemistry (Mosc)*, 43(23), 7503–13.

- [46] **Chen. W, Qiu. J, Shen. YM. r. (2012 , Oct).** Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs. *Drug Discov The*, 6(5), 230–7.
- [47] **Hrdina. R, Gersl. V, Klimtová. I, Simůnek. T, Machácková. J, Adamcová. M. (2000).** Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica Hradec Král Univ Carol Fac Medica Hradec Král*, 43(3), 75–82.
- [48] **Keizer. HG, Pinedo. HM, Schuurhuis. GJ, Joenje. H. (1990).** Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther*, 47(2), 219–31.
- [49] **Stěrba. M, Popelová. O, Vávrová. A, Jirkovský. E, Kovaříková. P, Geršl. V, et al. (2013 , Mar 10).** Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*, 18(8), 899–9.
- [50] **Halliwell. B. (2007, Nov 5).** Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147–50.
- [51] **Simůnek. T, Stěrba. M, Popelová. O, Adamcová. M, Hrdina. R, Gersl. V. (2009, Feb).** Anthracycline induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep PR*, 61(1), 154–71.
- [60] **Gammella. E, Maccarinelli. F, Buratti. P, Recalcati. S, Cairo. G. (2014).** The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol*, 5, 25.
- [52] **Arosio. P, Levi. S. (2010, Aug).** Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*, 1800(8), 783–92.
- [53] **Link. G, Tirosh. R, Pinson. A, Hershko. C. (1996, Mar).** Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of ironanthracycline interaction. *J Lab Clin Med*, 127(3), 272–8.
- [54] **Miranda. CJ, Makui. H, Soares. RJ, Bilodeau. M, Mui. J, Vali. H, et al. (2003, Oct 1).** Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. *Blood*, 102(7), 2574–80.

- [55] Ichikawa. Y, Ghanefar. M, Bayeva. M, Wu. R, Khechaduri. A, Naga Prasad. SV, et al. (2014, Feb). Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest*, 124(2), 617–30.
- [56] Mukhopadhyay. P, Rajesh. M, Bátkai. S, Kashiwaya. Y, Haskó. G, Liaudet. L, et al. (2009, May). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296(5), H1466–83.
- [57] Kerr. J. F, Wyllie. A. H. et Currie. A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-57.
- [58] Childs. AC, Phaneuf. SL, Dirks. AJ, Phillips. T, Leeuwenburgh. C. (2002). Doxorubicin treatment in vivo causes cytochromes C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer Res*, 62, 4592–8.
- [59] Andrieu-Abadie. N, Jaffrezou. JP, Hatem. S et al. (1999). L-Carnitine prevents doxorubicin induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation *FASEB J*. 13, 1501–1510.
- [60] Young. RC, Ozols. RF, Myers. CE. (1981). The anthracycline antineoplastic drugs. *Journal of Medicine*, 305, 139-153.
- [61] Doroshov. JH. (1991). Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *Journal of Medicine*, 324, 843-845.
- [62] Menna. P, Salvatorelli. E, Minotti. G. (2007). doxorubicin degradation in cardiomyocytes. *the journal of pharmacology and experemental therapeutics*, 322, 408-419.
- [63] Berry. GJ, Jorden. M . (2005). Pathology of radiation and anthracycline cardiotoxicity. *PediatrBlood Cancer*, 44(7), 630-7.
- [64] Bristow. MR, Masson. JW, Daniels. JR. (1978). The use of myocardial biopsy to monitor cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep*, 62, 1607–8.

- [65] **Abbot B . Kaplan A . Clin Chem The C.V. Mosby. Co, Louis. St. (1984).** Creatinine kinase. *Toronto. Princeton* , 1112-1116.
- [66] **Burtis A et al. (1999).** Tietz Textbook of Clinical Chemistry. *3rd ed AACC.*
- [67] **Gerhardt. W et al. (1979).** Creatine kinase B-Subunit activity in serum after immunohinhibition of M-Subunit activity. *Clin Chem, (25/7)*, 1274-1280.
- [68] **Tietz. N. W et al. (1995).** Clinical Guide to Laboratory Tests. *3rd ed AACC.*
- [69] **Morrow. DA, Cannon. CP, Jesse. RL et Al. (2007).** National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation, 115*, 356–75.
- [70] **Pesce. A, Kaplan A et al. (1984).** Lactate dehydrogenase. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, 438*, 1124-1117.
- [71] **Young. DS. (2001).** Effects of disease on Clinical Lab. *Tests, 4th ed AACC .*
- [72] **Murray. R, Kaplan A . Mosby. Co, Louis.St . (1984).** Aspartate aminotransferase. *Clin Chem The C.V*, 1112-1116.
- [73] **Pelletier. E, Campbell. P. G. C. & Denizeau. F. (2004).** Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. 182.
- [74] **Omulokoli. E, Khan. B and Chhabra. S.C. (2000).** Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol, 56*, 133-137.
- [75] **Kang. YJ, Chen. Y, Epstein. PN. (1996).** Surexpression of doxorubicin cardiotoxicity by over-expression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem, 271*, 12610–6.
- [76] **Dorr. R . (1991).** Chemoprotectants for cancer chemotherapy. *Semin Oncol, 18*, 48–58.
- [77] **Djerroumi. A, et Nacef. M. (2004).** *100 plantes médicinales d'Algérie.* Ed Palais du livre.

- [78] Longaray Delmare. A.P, Ivete T.M.P, Liane. A, Luciana. A.S et Sergio. E. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south brazil. *Food chemistry*, 100, 603-608.
- [79] Hans. W.K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales.
- [80] Pistelli. L. (2006, February 22-25). Photochemicals from lamiaceae: from nutraceutics to Hallucinogens. International symposium The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization.
- [81] Walker. J. B, Kenneth. J, Treutlein. J & Wink. M. (2004). *Salvia* (lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systmatics, radiation, and ecological pecializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany*, 91 (7), 111.
- [82] Loic. F . (2009). Monographie *Salvia officinalis*. *L3 environnementaliste* , 3-5.
- [83] Crorrquiste.A . (1968). the Evaluation and Classification of Flowering Plants. 396.
- [84] Gérard Debuigne & François Couplan . (2008-2009). PETIT LAROUSSE des PLANTES MÉDICINALES . *faculté libre des sciences et technologies L3 environnementaliste Monographie Salvia officinalis*, 352, 6.
- [85] KABOUCHE. A. (2005). Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. *Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine*, 389.
- [86] ISERIN. P. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*, Larousse VUEF. (2. Ed.14, Éd.) Paris.
- [87] MARC-ANTOINE-LOUIS, BRUNETON. (1796-2009). infectieuse.
- [88] OZANDA. P. (1977). *Flore du Sahara*. Paris: 2ème Ed. CNRS.
- [89] ANNE-CLAIRE. D, IANIS. D, MARIE-ALIX. V. (2008). Atelier sante environnement Risques et bénéfices possibles des Huiles Essentielles. *Ingéniorat du Génie Sanitaire*, 87 .

- [90] Reuter. S, Gupta. S.C, Chaturvedi. M.M, Aggarwal. B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med*, 49, 1603–1616.
- [91] Davies. K.J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279–289.
- [92] Heim. K.E, Tagliaferro. A.R, Bobilya. D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*, 13, 572–584.
- [93] Noguchi. N. (2002). Novel insights into the molecular mechanisms of the antiatherosclerotic properties of antioxidants: the alternatives to radical scavenging. *Free Radic. Biol.Med*, 33, 1480–1489.
- [94] Govindarajan. R, Vijayakumar. M, Pushpangadan. P. (2005). Antioxidant approach todisease management and the role of “Rasayana” herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol*, 99, 165–178.
- [95] Hussain. S.P, Hofseth. L.J, Harris. C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 276–285.
- [96] Berger.M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr. Clin. Métabolisme*, 20, 48–53.
- [97] Defraigne. J.O, Pincemail. J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *RMLG Rev. Médicale*, 63, 10–19.
- [98]Favier. A . (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr*, 64, 390-396.
- [99] Pelletier. E, Campbell. P. G. C, & Denizeau. F. (2004). Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. 182.

- [100] **Droillard. M.J, & Paulin. A. (1990).** Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence. *Plant Physiology*, 94 (3), 1187-1192.
- [101] **Yoshimoto. M, Sakamoto. H, Yoshimoto. N, Kuboi. R, & Nakao. K. (2007).** Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver : Catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme and Microbial Technology* , 41, 849–858.
- [102] **Bédane. C. (2008).***Photodermatologie : Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie* (éd. Wolters Kluwer). France.
- [103] **Carr. A, Frei. B . (1999).** Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions *FASEB J*, 13(9), 1007-1024.
- [104] **Greff. M. (2011, mars 24 au 27).** Post'U FMC-HGE, *Springer Edition*. 39.
- [105] **DUTTA-ROY. A. K. (1999).** Molecular Mechanism of Cellular Uptake and Intracellular Translocation of α -Tocopherol: Role of Tocopherol-binding Proteins. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 967-971.
- [106] **Grégory Lacarz. (s.d).** thèse relation entre stress oxydant et homéostasie glucidique du diabète de type 2 .
- [107] **Bruneton J. (1999).***Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (éd. 3e éd). Lavoisier, Tech & Doc, France.
- [108] **Diallo. A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (MYRTACEAE). *Thèse de Doctorat*.
- [109] **Marfak. A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides : Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges*, 30-35.

- [110] **Ekoumou. C. (2003).** Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelle utilisés dans le traitement des infections Urinaire et la Cystite. *Thèse Pharmacie*, 145.
- [111] **Ray. S. D, Wong. V, Rinkovsky. A, Bagchi. M, Raje. R. R, and Bagchi. D. (2000).** Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*, 107, 105-128.
- [112] **Omulokoli. E, Khan. B, and Chhabra. S.C. (2000).** Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 133-137.
- [113] **Roué. M. (2011).** Contribution de la flore bactérienne associée au métabolisme secondaire de l'éponge calcaire *Clathrinaclathrus*. *Doctorat de l'université Pierre et Marie Curie*.
- [114] **ISERIN. P, MASSON. M, RESTELLINI. J. P. (2007).** *Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins* (éd. Larousse). Paris, France.
- [115] **William G.Hopkins. (2003).** *Physiologie végétale* (éd. www.deboeck.com).
- [116] **Wallace. R.J. (2004).** Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society*, 63, 621–629.
- [117] **Dr. DJAHRA Ali Boutlelis. (2014-2015)** Cours Phytochimie II 2ème Année Master. *Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued*.
- [118] **BenmahdiA. (2001).** Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie*, 6, 11-27.

- [119] Dohou.N, Yamni. K, Tahrouch. S, Idrissi Hassani. L. M, Badoc. A, & Gmira. N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bull. Soc. Pharm*, 142, 61-78.
- [120] Subhash. C, Joshi. A, Arti. R, Verma. B, Chandra. S, Mathela A. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species Food and Chemical. *Toxicology*, 48 , 37–40.
- [121] Wong. J. W, Hashimoto. K, & Shibamoto. T. (1995). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2707–2712.
- [122] Bounatirou. S, S. S. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitata*.
- [123] Zhong. J.F, Wang. S.P, Shi. X.Q, Mu. L.L, Li. G.Q. (2010, Dec). Hydrogen sulfide exposure increases desiccation tolerance in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 56(12), 1777-82.
- [124] Liu. J, Jia.L, Kan. J, Jin. C-h. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 310–316.
- [125] Wu. H. (2007). *Isolation and characterization of natural products from ginger and Allium Ursinum*. ProQuest Edition.
- [126] Hadbaoui. Z. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. *Thèse de Doctorat Université de Kasdi Merbah* .
- [127] Le. K, Chiu. F. N. G. K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii* . *Food vvv Chemistry*, 105, 353-363.
- [128] Oyaizu. M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

- [129] **Sanmugapriya. E, Venkataraman. S .(2006)**. Studies of hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn .Seeds on CCl₄ induced acute hepatic injury in expermental rats . *J Ethnopharmacol*, 105 , 154-60.
- [130] **Ohkawa. H, Ohishi. N, Yagi. K. (1979)**. Assay of lipid peroxides in animal tissue by hiobarbituric reaction. *Anal biochen* , 95 , 351-8 .
- [131] **Ellman. GL. (1959)**. Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.
- [132] **Claiborne. A. (1985)**. Catalase activity. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. 283–284.
- [133] **Gerald. Batist . (2001, March 1)**. Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared With Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19(5), 1444-1454.
- [134] **Bernardi. P, Petronili. V. (1996)**. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: A critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr*, 28, 77–90.
- [135] **Valko. M, Leibfritz. D, Moncol. J, Cronin. M.T.D, Mazur. M, Telser. J. (2007)**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 39, 44–84.
- [136] **Cuendet. M, Hostettmann. K and Potterat. O. (1997)**. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* , 80, 1144-1152.
- [137] **Miller. D.M, Buettner.G.R, and Aust. S.D. (1990)**. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic. Biol. & Med*, 8, 95–108.
- [138] **Iliskovic. N, Li. T, Khaper. N, Palace. V, Singal. P.K. (1998)**. Modulation of adriamycin-induced changes in serum free fatty acids, albumin and cardiac oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem*, 188, 161–166.
- [139] **Je-Ruei Liu, Guo-Feng Chen, Hui-Nung Shih, Ping-Chung Kuo . (2008)**. Enhanced antioxidant bioactivity of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) products prepared using nanotechnology. *Phytomedicine*, 15, 23–30.

- [140] **Bektas Tepe. (2008).** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L). from Turkey Bioresource Technology, 99, 1584–1588.
- [141] **Amić. D, Davidović-Amić. D, Bešlo. D, and Trinajstić. N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61.
- [142] **Shariffar. F, Dehghan-Nudeh. G, and Mirtajaldini. M. (2008).** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium*. *Food Chemistry*, 1-19
- [143] **Bourgou Soumaya, Ksouri Riadh, Bellila Amor, Skandrani Ines, Falleh Hanen, Marzouk Brahim. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 48-55.
- [144] **Sridevi Muruhan et al. (2013).** In vitro antioxidant activities of *Solanum surattense* leaf extract *Asian Pac J Trop Biomed.* 3(1), 28-34.
- [145] **Savoie. J-M, Minvielle .N, Largeteau M.L. (2008).** Radical scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Sci. Food Agric*, 88, 970–975.
- [146] **Iarussi. D. P, Indolfi. F, Casale. P, Coppolino. M. A, Tedesco et M. T. Di Tullio. (2001).** «Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood». *Curr MedChem*, 8(13), 1649-1660.
- [147] **Walker. DB. (2006, Jan).** Serum chemical biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing. *Toxicol. Pathol*, 34(1), 94 – 104.
- [148] **Andreadou. I, Sigala. F, Iliodromitis. E.K, Papaefthimiou. M, Sigalas. C, Aligiannis. N, Savvari. P, Gorgoulis. V, Papalabros. E, Kremastinos. D. (2007).** Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J.Mol. Cell Cardiol*, 42, 549-558.
- [149] **Xuwan. Liu, Zhongyi Chen, Chu Chang Chua, YanShan Ma, George. A, Youngberg, Ronald Hamdy, and Balvin H. L. Chua. (2002).** Melatonin as an

- effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, 254-263.
- [150] **Leena. P, Balaraman. R. (2011).** Effect of Green Tea Extract on Doxorubicin Induced Cardiovascular Abnormalities: Antioxidant Action. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (1), 89-96.
- [151] **Noha Ahmed EL-Boghdady (june 2013).** Increased cardiac endothelin-1 and nitric oxide in adriamycin induced acute cardiotoxicity: protective effect of Ginkgo biloba extract *Indian journal of biochemistry & biophysics* . 50, 202-209
- [152] **Chang. L, Ren. Y, Liu. X, Li. W.G, Yang. J, Geng. B, Weintraub. N.L, Tang. C. (2004).** Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 43, 165–170.
- [153] **Bandari UmaMaheshc, ShwetaShrivastavaa, MadhusudhanaKunchab, BidyaDharSahub, ChallaVeerabhadraSwamya, RajeswaraRaoPragadac, V.G.M.Naidua. (2013).** RamakrishnaSistla Ethanolic extract of *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *environmental toxicology and pharmacology*, 36, 840–849.
- [154] **Singh. G, Singh. AT, Abraham. A, Bhat. B, Mukherjee. A, Verma. R, Agarwal. SK, Jha. S, Mukherjee. R, Burman. AC. (2008).** Protective effects of *Terminalia arjuna* against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Ethnopharmacol*, 17, 117(1):123-9.
- [155] **Sathishsekar. D, Sivagnanam. K, Subramanian. S. (2005, May 1).** *Die Pharmazie*. *Die Pharmazie- An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 60(Number 5), 383-387.
- [156] **Vergely. C, D. S. (2007).** Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclines: from basic concepts to clinical data. *Heart Metab*, 35, 1–7.
- [157] **Li. L, pan. Q, Han. W, Lui. Z., Hu. X. (2007).** Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling. *Clin cancer Res*, 13, 6753-6760.

- [158] **Abdel-wahab. M.H, El-Mahdy. M.A, Abd-Ellah. M.F, Helal. G.K, Khalifa. F, Hamada. F.M.A. (2003).** Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart . *Pharmacological Research*,48, 461-465 .
- [159] **Patel.S.S, Verma.N.K,Rathore.B,Nayak.G, Singhai.A.K, Singh. P. (2011).** Cardio-protective effect of *Bombax ceiba* flowers against a cute adriamycin induced myocardial infarction in rats. *Revista Brasileirade Farmacognosia*, 21, 704–709.
- [160] **Yilmaz. S, Atessahin. A, Sahna. E, Karahan. I, Ozer. S. (2006).** Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 218, 164–171.
- [161] **Santos. DL, Moreno. AJ, Leino. RL, Froberg. MK, Wallace. KB. (2002).** Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 185, 218–227.
- [162] **Saad. SY, Najjar. TA, Al-Rikabi. AC. (2001).** The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res*, 43, 211–218.

Bouaouina Dalila

Date de soutenance : 01 /07/2017

Boulhabel Hala Roumeissa

Bousba Esma

Thème : L'effet préventif de la plante médicinale Algérienne *Salvia Officinalis* contre la toxicité cardiaque induite par la Doxorubicine

Nature du diplôme : Master

Domaine : Science de la nature et de la vie

Option : Toxicologie

Résumé

L'utilisation de l'agent antitumorale doxorubicine est limitée par sa cardiotoxicité, dans le quel leur mécanisme principale est l'induction du stress oxydatif.

La présente étude visait à évaluer le stress oxydatif induits par la doxorubicine dans le cœur et étudier l'effet antioxydant et cardioprotecteur de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* par différentes méthodes.

La toxicité cardiaque aigüe de la DOXO a été évaluée chez des rats mâles par injection intrapéritonéal à une dose de 15 mg/kg, après le traitement précédant de l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* pendant 10 jours par voie orale. Par des dosages biochimiques, évaluation du MDA, GSH, CAT, et des coupes histologiques.

D'après les résultats; il apparaît que l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis* protègent le cœur contre la toxicité aigüe de la doxorubicine en augmentant le niveau des enzymes antioxydants GSH et catalase, et l'inhibition de la peroxydation lipidique ce qui empêche la libération des transaminases cardiaque et CPK dans le sang.ces résultats on été confirmés par les études histologiques.

Ces résultats indiquent clairement que l'extrait butanolique de *Salvia Officinalis*. Joue un rôle protecteur important vis-à-vis la cardiotoxicité provoquée par la doxorubicine.

Mots clés : *Salvia Officinalis*, la doxorubicine, la carditoxicité, stresse oxydative.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et d'environnement, faculté des sciences de la nature et de la vie. université des Frères Mentouri, Constantine.

Jury d'évaluation:

Président du jury : Mr lalaoui Korichi (Pr à l'UFMC)

Rapporteur : Mme Ihoual Safia (MA à l'UFMC)

Examineur : Mme Boubekri Nassima (MC à l'UFMC)

Mme Mouri Fouzia (MA à l'UFMC)