

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى-جيجل-

Faculté des Sciences de la Nature et
la Vie
Département : Biologie Cellulaire et
Moléculaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option: Sciences Pharmacologiques

Thème

**Evaluation de la génotoxicité et du stress oxydatif induits par
le valsartan : un antagoniste de l'angiotensine II**

Membres du Jury :

Présidente : Dr : LARICHE .N
Examineur : Pr : LAHOUEL .M
Encadreur : Dr : BOUHAFS. L

Présenté par :

BELLOUT Chafiaa
BOUROUISSA Nabila

Numéro d'ordre :

Année Universitaire : 2018-2019

Remerciements

Tout d'abord nous remercions Allah le tout puissant qui nous a éclairé le bon chemin.

Nous tenons à remercier très vivement Notre encadreur

Dr. Bouhafis Leila

Qui est un potentiel infini pour les conseils avisés et l'encouragement constant.

Nous tenons à exprimer nos grande considération à

Pr. Lahouel Mesbah et Dr Lariche Nasrine pour avoir accepté de prendre part ou jury de soutenance

Nos vifs remerciements s'adressent à toute la promotion de la 2^{ème} année Master en science pharmacologique.

Enfin Nous associons nos remerciements à toute personne d'étant montré coopérant de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de fin d'étude.

Ainsi que tous les professeurs qui ont contribué à notre formation.



Chafiaa et Nabila

Dédicace

*De tous nos cœurs, nous dédions ce
modeste travail :*

*A nos très chères mères source de
tendresse*

*A nos très chers pères, qui nous
encourage*

A nos très chers sœurs et frères

A nos familles

A nos proches amies

*A nos collègues de Sciences
pharmacologiques*

Et merci à tous



Chafiaa et Nabila

Liste de figures
Liste de tableaux
Liste d'abréviations
Introduction..... 01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : La Génotoxicité

I.1.Définition..... 03
I.2.Agents génotoxiques..... 03
I.2.1.Agents chimiques..... 03
I.2.2.Agents physiques..... 04
I.2.3.Agents biologiques..... 04
I.3.Mécanisme de la génotoxicité..... 04
I.3.1.Les lésions primaires..... 04
I.3.2.Les mutations géniques..... 05
I.3.3.Les mutations chromosomiques..... 05
I.4.Exploration..... 06
I.4.1.Test de comète..... 06
I.4.2.Test d'âmes..... 07
I.4.3.Test de micronoyaux..... 07
I.4.3.1.Historique..... 07
I.4.3.2.Définition..... 07
I.4.3.3 .Mécanisme de formation des micronoyaux..... 09
I.4.3.5.Les avantages et les inconvénients..... 09
I.5. Rappels sur l'hématopoïèse..... 09
I.5.1.Erythropoïese..... 11

Chapitre II : Valsartan

II.1.Généralité..... 12
II.2.Les Propriétés physico-chimiques..... 13
II.3.Pharmacocinétique..... 13
II.4.Pharmacodynamique..... 14
II.5.Effet indésirable..... 15
II.6.Toxicité aiguë et chronique..... 16

Etude expérimentale**Matériel et méthodes**

I. Matériel.....	19
I.1. Valsartan.....	19
I.2. Cyclophosphamide.....	19
I.4. Matériel biologique et condition d'élevage.....	19
I.5. Répartition et traitement des animaux.....	19
I.6. Sacrifice et prélèvement des organes.....	20
II. Méthodes.....	21
II.1. Test de micronoyaux dans le sang périphérique.....	21
II.1.1. Principe.....	21
II.1.2. Mode opératoire.....	21
II.1.3. Lecture.....	22
II.2. Dosage tissulaire.....	22
II.2.1. Préparation de la fraction cytosolique.....	22
II.2.2. Dosage des protéines.....	22
II.2.3. Dosage du malonaldéhyde (MDA).....	22
II.2.4. Dosage du glutathion réduit (GSH).....	22
II.3. Dosage de l'activité enzymatique antioxydante.....	23
II.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	23
II.3.2. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase(SOD).....	23
II.4. Etude histologique.....	24
II.5. Evaluation statistique.....	24

Résultats et discussion

I. Effet des traitements sur le taux de mortalité.....	24
II. Evaluation macroscopique.....	25
III. Evaluation du taux de micronoyaux dans le sang périphérique.....	26
IV. Evaluation du stress oxydatif tissulaire hépatique et rénale.....	28
IV.1. Variation du MDA.....	28
IV.2. variation de GSH.....	30
IV.3. Evaluation des enzymes antioxydantes (CAT et SOD).....	32
IV.3.1. Variation de la CAT.....	32

IV.3.2. Variation de l'activité enzymatique de la SOD.....	33
V. Etude comparative entre la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité.....	34
VI. Analyse histologique hépatique et rénale.....	34
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes liaisons premières qui touchent l'ADN.....	05
Figure 2 : Schéma représente une insertion chromosomique et une délétion chromosomique.	05
Figure 3 : Représentation schématique d'une inversion chromosomique et translocation réciproque.....	06
Figure 4 : Exemples d'observation des noyaux par le test des comètes.....	07
Figure 5 : Schéma représente la formation des micronoyaux.....	09
Figure 6 : Schéma de l'hématopoïèse.....	10
Figure 7 : La formule chimique de valsartan.....	12
Figure 8 : Métabolisation de valsartan en valeryl-4-hydroxy VAL.....	14
Figure 9 : Représente le mécanisme d'action de valsartan.....	15
Figure 10 : Photographie représente certains exemplaire des frottis réaliser pour le test de micronoyaux.....	26
Figure 11 : Variation des taux cytosolique du MDA rénale et hépatique des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide	29
Figure 12 : Variation de l'activité cytosolique de la GSH dans les tissus rénales et hépatiques des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide	31
Figure 13 : Variation de l'activité de la CAT hépatique et rénale des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide	32
Figure 14 : Variation de l'activité enzymatique de la SOD hépatique et rénale des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide	33
Figure 15 : Coupes histologiques du foie des lots témoin négatif (photo A) témoin positif (photos B), traité par valsartan (photos C ₁ , C ₂ , C ₃) après coloration à l' H et I t F (GR×40).....	36
Coupes histologiques des reins des groupes témoin négatif (A), souris traitées par cyclophosphamide(B), souris traitées par le valsartan(C), après coloration à l'H et I t F (GR×40).....	37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Représente les propriétés physico-chimiques de valsartan.....	13
Tableau 2 : Représente les résultats de test de la toxicité aiguë.....	16
Tableau 3 : Représente les résultats de test de a toxicité chronique.....	16
Tableau4 : Taux de mortalité (exprimés en%)des souris de différents lots pendant la période du traitement	24
Tableau5 : Représente le taux des Micronoyaux chez les souris de différents lots de l'expérience, exprimée en moyenne \pm écart type.....	26
Tableau6 : Comparaison de la variation des paramètres de stress oxydatif hépatique et rénale après administration de 2600 mg/kg de valsartan par gavage pendant deux jours.....	34

AGPI	Acides gras polyinsaturés
AT2	Angiotensine II.
BBC	Bleu Brillant de Coomassie
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BSA	Bovin Sérum Albumine
CAT	Catalase
CFU-Baso	Colony Forming Unit-Basophil
CFU-Eo	Colony Forming Unit-Eosinophil.
CFU-G	Colony Forming Unit-Granulocyte
CFU-M	Colony Forming Unit Macrophage CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte
CP	Cyclophosphamide
CRD	Centre de Recherche et de Développement
CYP450	Cytochrome P 450
DSEIO	Dose sans effet indésirable observable
DSEO	Dose sans effet observable
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
EI	érythrocytes immature.
EIMN	érythrocytes immatures micronucléus.
EMA	Agence européenne des médicaments
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
G	Guanine
GMP	Granulocyte/Monocyte Progenitor
GSH	Glutathion réduit
His	Histidine
LTM	Laboratoire de toxicologie moléculaire
MDA	Malondialdehyde
MEP	Megakaryocyte/Erythroid Progenitor.
MGG	May –Grünwald Giemsa
MN	Micronoyaux
NDEA	N-nitrosodiéthylamine
NDMA	N-nitrosodiméthylamine

OCDE	Organisation de coopération et de développement économique.
SCE	Sister Chromatid Exchange
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide Thiobarbiturique
TCA	Trichloroacetic Acid
TNF	Tumor Necrosis Factor

Introduction

Dans le cadre du processus d'évaluation de la sécurité des médicaments, les autorités de réglementation ont besoin de données sur le potentiel génotoxique des molécules à usage thérapeutique. Des études précliniques sont généralement menées pour obtenir le profil toxicologique de ces substances, c'est la raison pour laquelle les tests de génotoxicité sont devenus une partie intégrante des exigences réglementaires (Taglietti *et al.*, 2010).

Ces tests visent à mettre en évidence l'altération par des composés chimiques ou physiques du matériel génétique pouvant conduire à des mutations ou à des lésions génotoxiques qui ne sont pas efficacement et correctement réparées par les systèmes enzymatiques adéquats, Ils détecteront donc principalement les lésions de l'ADN et/ou des chromosomes ou ses conséquences (Fardel *et al.*, 2009).

Le valsartan est un antagoniste compétitif puissant et sélectif des récepteurs AT1 de l'angiotensine II, indiqué pour le traitement de l'hypertension artérielle. En bloquant les récepteurs sur lequel l'angiotensine II se fixe normalement, le valsartan met fin à l'action de cette hormone, ce qui permet aux vaisseaux sanguins de s'élargir et entraîne une diminution de la pression artérielle (Mehtap et Sevgi, 2017).

Ce médicament a été développé pour la première fois par Novartis et couvre un vaste marché dans les pays développés et les pays en développement. Le valsartan est considéré comme une très bonne cible pour les industries génériques (Deka et Bhattacharjee, 2018).

En juillet 2018, la US Food and Drug Administration (USFDA) et l'Agence européenne des médicaments (EMA) annoncent un défaut de qualité affectant certaines spécialités à base de valsartan. Il s'agit d'une impureté dénommée la N-Nitrosodiméthylamine (NDMA) appartenant à la classe des nitrosamines, apparue au cours de la fabrication de la substance active (Deka et Bhattacharjee, 2018 ; Naseem Ahmad *et al.*, 2019 ; Parr et Joseph, 2019).

L'alerte a vite été relayée par plusieurs pays du monde, entraînant le retrait des médicaments fabriqués à base du principe actif : le valsartan.

La NDMA est classée comme un cancérigène probable pour l'homme (CIRC, 1978 ; Fournier *et al.*, 2006). Il est aussi largement admis que la NDMA induit une fibrose hépatique et une cirrhose (Haggerty et Holsapple, 1990).

Elle est également une molécule fortement génotoxique même à faible dose (ATSDR et EPA, 1989), la toxicité est provoquée par des métabolites intermédiaires produits lors du métabolisme de la NDMA plutôt que par le composé d'origine lui-même. La génération élevée de radicaux libres par la NDMA contribue à l'augmentation du stress oxydatif (Areeba *et al.*, 2011).

Donc la population ou plus spécifiquement les malades hypertensifs sous traités par le valsartan sont exposés au risque lié à ce défaut de qualité. (EMA, 2018).

Comme il n'y a que très peu de travaux scientifiques abordant la génotoxicité du valsartan nous sommes alors intéressées de contribuer à ce sujet d'actualité.

Notre étude a pour objectif ; d'évaluer la génotoxicité du valsartan dans le sang périphérique par le test de micronoyaux en prenant la cyclophosphamide comme témoin positif, ce dernier est un anticancéreux de la famille des immunosuppresseurs connu par sa génotoxicité (Rehman *et al.*, 2012), évaluer et comparer l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité induites par ce médicament via des dosages du stress oxydatif et enfin chercher les modifications tissulaires et cellulaires au niveau du foie et rein par une étude histologique.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I

La génotoxicité

I.1. Définition

La définition de la génotoxicité selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1993) inclut à la fois des effets directs et indirects sur l'ADN. La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, se définit comme la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques dits « génotoxiques » à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations géniques ou chromosomiques (Dégremont et Cachot, 2009). Les modifications du matériel génétique causées par ces dommages, dans le cas où ils ne sont pas ou sont mal réparés, pourront alors avoir des conséquences délétères sur l'organisme (Graillot, 2012).

Pour que les dommages conduisent à des mutations, ils doivent persister dans l'ADN après un cycle de réplication. Une mutation peut être impliquée des réarrangements importants ou n'affecte qu'une ou quelques paires de bases (Elespuru et Sankaranarayanan, 2007). Les effets seront différents en fonction de la localisation de la mutation : si elle touche les cellules germinales, elle peut occasionner un défaut génétique héréditaire, alors que si elle affecte les cellules somatiques, elle peut être à l'origine de l'initiation d'un processus de cancérogenèse (Erickson, 2010).

I.2. Agents génotoxiques

Les agents génotoxiques participent à l'initiation du cancer en introduisant dans l'ADN des lésions, transmissibles au génome des cellules filles lors de la division cellulaire. Ils peuvent également participer à la phase de progression de la tumeur. De plus, l'accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules somatiques peut jouer un rôle dans le processus de vieillissement accéléré, le dysfonctionnement de l'immunité, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Flora et Izzotti, 2007 ; Hoeijmakers, 2009 ; Slatter et Gennery, 2010).

I.2.1. Agents chimiques

Ce sont des mutagènes électrophiles qui établissent une liaison covalente avec un site nucléophile d'une base d'ADN. Parmi les sites nucléophiles, les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles de bases constitutives d'ADN qui constituent les cibles privilégiées des agents chimiques génotoxiques (Goff *et al.*, 2006). On en distingue :

➤ Les analogues d'acide nucléique

Sont des substances présentes dans la nature et qui ont une structure similaire à celle de l'acide nucléique (Jean *et al.*, 2000).

Exemple : Le 5bromo-uracil qui peut induire une mutation ponctuelle par la substitution de base T ou G (Poštulka *et al.*, 2017).

➤ **Les agents intercalaires**

Sont des molécules capables d'inclure réversiblement entre deux nucléotides d'ADN.

Exemple : acridine, proflavine induisent une délétion ou insertion d'un nucléotide sur le brin opposé après leur intercalation au cours de la réplication (Rogers *et al.*, 1982).

➤ **Les modificateurs de bases**

❖ **Les agents alkylants**

Sont des électrophiles qui transfèrent par covalence des groupes alkyle sur les bases d'ADN, Il existe plusieurs groupes différents d'agents alkylants. tel que : les moutardes à l'azote, et les composés triazines (Benhacine et Sahil, 2016 ; Lucy *et al.*, 2014).

I.2.2. Agents physiques

Les agents physiques sont principalement les radiations ionisantes hautement énergétiques telles que les rayons X ou gamma et les radiations non ionisantes comme la lumière ultraviolette. Ces agents peuvent induire des mutations variables (Dégremont et Cachot, 2009).

I.2.3. Agents biologiques

Les mutagènes biologiques sont des virus tels que les rétrovirus (sida), les Filoviridae (Virus d'Ebola). Leur génotoxicité peut aboutir à la cancérogenèse (Dégremont et Cachot, 2009).

I.3. Mécanisme de la génotoxicité

Il apparaît que l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques n'est pas la même. Par ailleurs, il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques, chromosomiques (Orsière *et al.*, 2005).

I.3.1. Les lésions primaires

En raison de la grande variété de structures et de modes d'action des substances génotoxiques, il existe un grand nombre de dommages à l'ADN possibles. Ces altérations structurales de l'ADN appelées lésions primaires concernent principalement des modifications des bases constitutives de l'ADN ou des cassures affectant un seul ou les deux brins de l'ADN (Dégremont et Cachot, 2009).

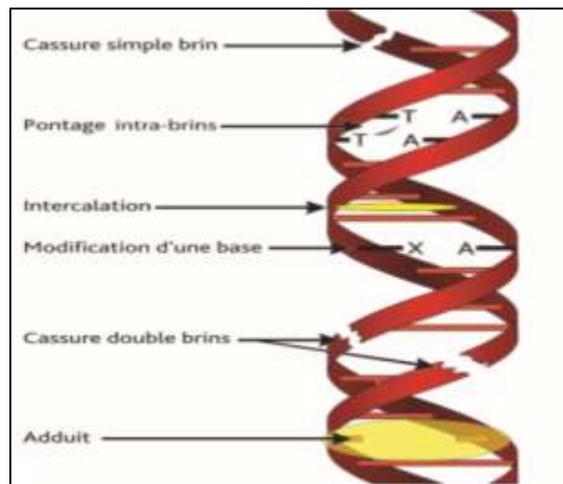


Figure 1 : Les différentes lésions primaires qui touchent l'ADN (Dégremont et Cachot, 2009).

Les produits chimiques peuvent produire des altérations directement en tant qu'adduits ou indirectement par intercalation d'un chimique entre les paires de bases (par exemple, 9-aminoacridine) (Gupta, 2016).

I.3.2. Les mutations géniques

On distingue les mutations frame-shift et les mutations de substitution d'une ou plusieurs paires de bases. Les mutations frame-shift décalent le cadre de lecture par addition ou délétion d'une base, de 2 bases ou d'un nombre non-multiple de 3 (Vincent, 1993).

I.3.3. Les mutations chromosomiques

Les mutations chromosomiques est un ensemble des évènements de réarrangements de génome au cours duquel un génome voit son organisation générale modifiée par les aberrations du nombre de chromosomes (aneuploïdie) et les aberrations de structure (délétion ou l'addition de fragments chromosomiques, ou par l'échange des fragments entre chromosomes non homologues et à la duplication ou à l'inversion d'un segment chromosomique) (Sobreira *et al.*, 2011).

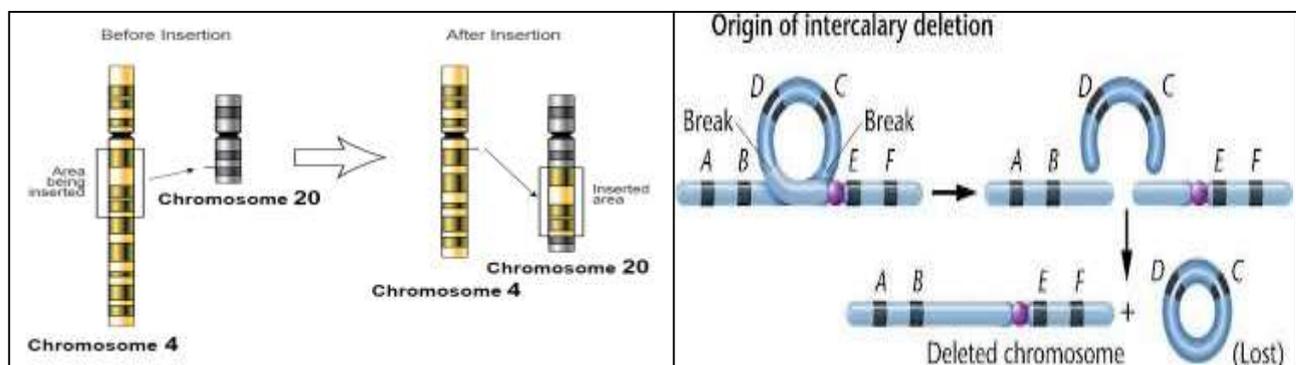


Figure 2 : Schéma représentant une insertion chromosomique – à gauche - et Délétion chromosomique – à droite - (Iengar, 2012).

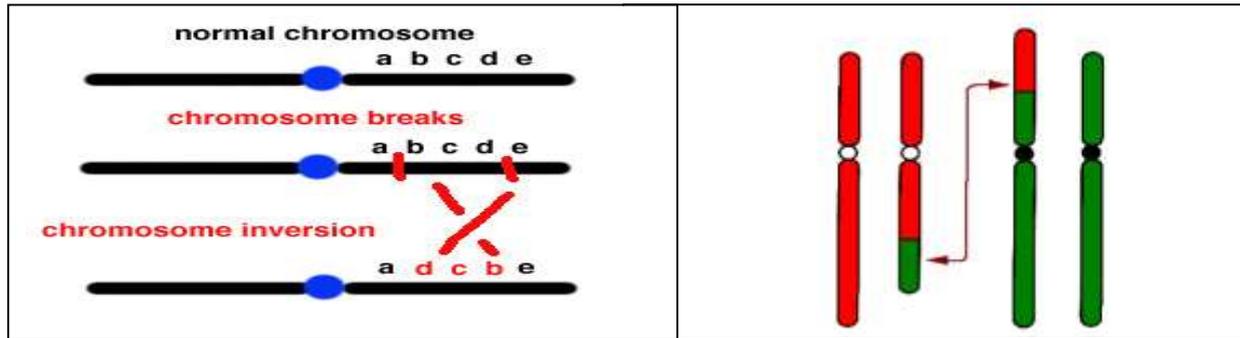


Figure 3 : Représentation schématique d'une Inversion chromosomique – à gauche- et translocation réciproque – à droite- (Benhacine et Sahil, 2016).

I.4. Exploration

Plusieurs tests de génotoxicité ont été développés pour effectuer un criblage rapide du potentiel génotoxique des xénobiotiques, lors de l'évaluation des risques de substances génotoxiques, il est recommandé d'utiliser une batterie de tests *in vitro* et *in vivo*, qui comprennent les principales altérations de l'ADN, tels que des tests de mutation génique, des tests d'aberration chromosomique ainsi que des tests observant des lésions primaires de l'ADN (Eastmond *et al.*, 2009 ; EFSA, 2011 ; Kirkland *et al.*, 2007 ; Thybaud *et al.*, 2007).

Les lésions primaires de l'ADN peuvent être évaluées par le test des comètes, ou par la détection de différents types d'adduits ; les mutations géniques par le test d'Ames et le « Mouse lymphoma assay », les lésions chromosomiques clastogènes et aneugènes par le test des aberrations chromosomiques ou le test des micronoyaux (Ricou-Berthelot, 2014).

I.4.1. Test de comète

Le test des comètes également appelé électrophorèse sur micro gel d'agarose, a été développé par Singh *et al.*, (1988), est un test court, rapide, sensible et également simple de génotoxicité, peut être applicable *in vivo* et *in vitro* à tous types cellulaires, pour étudier les lésions primaires de l'ADN (Ostling et Johanson, 1984).

Ce test est basé sur le principe de la charge négative portée par l'ADN qui, sous influence du courant de migration, se déplace vers l'anode.

La présence de cassures permet à l'ADN de migrer et le noyau prend donc la forme d'une comète en présence de marqueur acridine orange. On distingue une partie contenant de l'ADN non endommagé, appelée tête de la comète et une partie plus allongée, contenant l'ADN fragmenté ayant migré, constituant la queue de la comète (Michel, 2011).

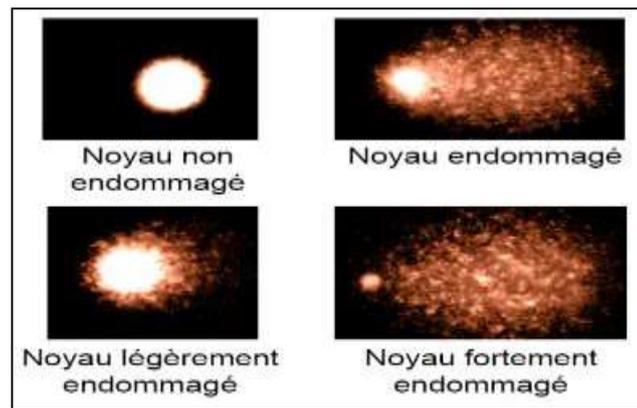


Figure 4 : Exemples d'observation des noyaux par le test des comètes (Lemière ,2014).

I.4.2. Test d'Ames

Appelé aussi le mutatest, il s'agit d'un des premiers tests *in vitro*, mis au point par le Pr. Bruce Ames (1973), utilisant des cellules procaryotes mutantes (*Salmonella thyphimurium*), pour le but d'évaluer la mutagenèse et la cancérogenèse de tel substances chimiques. Le principe de ce test basé sur l'effet que la souche bactérienne utilisé a porté une mutation dans l'opéron gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. En présence d'agent mutagène, cette mutation peut réserver vers la capacité à synthétiser à nouveau l'histidine. Ainsi le test consiste à quantifier ces réversions en étudiant des relations dose-réponse (Viala et Botta, 2009).

I.4.3. Test de micronoyaux

I.4.3.1. Historique

Le micronoyau (MN), également appelé en hématologie corps de Howell – Jolly, a été introduit en 1951 en rapport avec des petits fragments acentriques expulsés du noyau principal aux derniers stades de l'anaphase dans les érythrocytes. Depuis 1959, les MN ont été proposés comme indicateurs de génotoxicité. Cependant, l'analyse de fréquence des MN comme test de cytogénétique n'a été proposée qu'en 1970 par Boller et Schimid (Araldi *et al.*, 2015).

I.4.3.2. Définition

Un micronoyau est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger (1968) comme « un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales des chromosomes » (Rieger *et al.*, 1968).

L'évaluation de la fréquence du micronoyau *in vivo* est le test principal d'une batterie de tests de génotoxicité et est recommandée par les organismes de réglementation du monde entier dans le cadre de l'évaluation de la sécurité des produits (Paulo *et al.*, 2015).

I.4.3.3. Mécanisme de formation de micronoyaux

Les micronoyaux sont de petites entités nucléaires qui peuvent être constituées :

- De chromosomes entiers, perdus au cours de la mitose précédente. Ils représentent alors la conséquence d'une altération des structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes. Les divers systèmes protéiques impliqués sont représentés par l'appareil mitotique, constitué de diverses catégories de microtubules gérant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique puis la migration des chromosomes à l'anaphase, les centrosomes, à partir desquels se structure l'ensemble des microtubules, et les kinétochores (Fenech *et al.*, 2005). La formation de ces micronoyaux est consécutive à l'action d'agents aneugènes.
- De fragments chromosomiques acentriques. Ils représentent alors la conséquence d'une cassure double brin non réparée de la molécule d'ADN, l'extrémité du bras chromosomique cassé n'étant plus rattachable au fuseau mitotique, faute de centromère. Les cassures double brin qui résultent de ces modifications représentent des lésions primaires de l'ADN particulièrement sévères car difficilement réparables. La non réparation d'une cassure double brin peut mener à un réarrangement asymétrique des chromosomes donnant un chromosome dicentrique et un fragment acentrique (Mateuca *et al.*, 2006). Les centromères des chromosomes dicentriques sont tirés aux pôles opposés de la cellule en anaphase formant un pont nucléoplasmique (PNP) entre les deux cellules filles et un fragment acentrique qui formera un MN (Thomas *et al.*, 2003 ; Fenech, 2005). Ces MN peuvent être directement induites par des agents génotoxiques dits clastogènes, les plus connus d'entre eux étant les rayonnements ionisants et les composés chimiques (figure 5).

Ces deux types de contenu correspondent à des mécanismes de formation fondamentalement différents. En conséquence, les micronoyaux témoignent de la survenue d'événements aneugènes et/ou clastogènes.

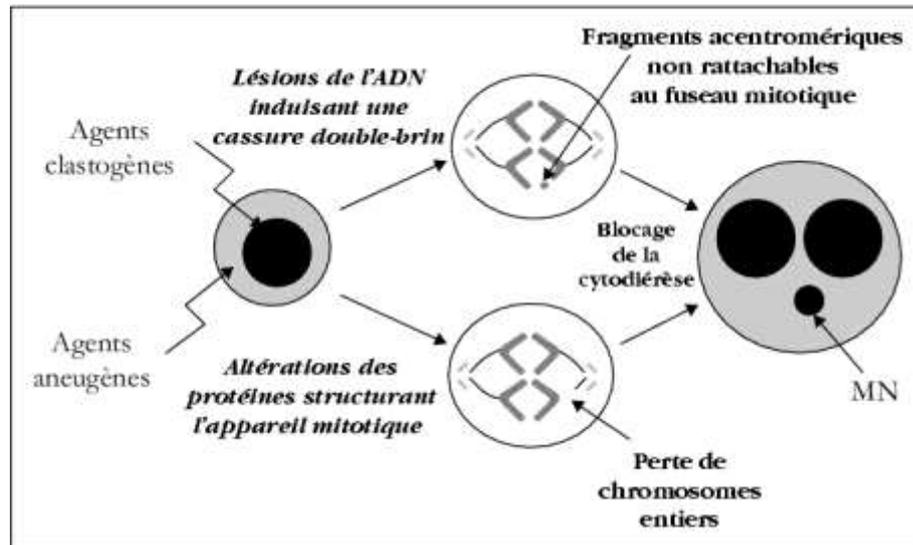


Figure 5 : Formation d'un micronoyau (Iarmarcovai et al., 2007).

I.4.3.4. Les avantages et les inconvénients

Le test de micronoyaux est simple à réaliser, en plus d'être rapide, ses plus grands avantages sont la fiabilité et le coût peu élevé de la technique. Ce test est largement utilisé en épidémiologie moléculaire et en cytogénétique pour évaluer la présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans la population exposée à des agents génotoxiques ou pour étudier un profil génétique (Fenech *et al.*, 1999).

Une des limites de cette technique est qu'elle ne permet pas de détecter toutes les aberrations structurales (Volders *et al.*, 2002). De plus, le nombre de micronoyaux (MN) n'est pas entièrement proportionnel aux dommages à l'ADN.

I.5. Rappel sur hématopoïèse

C'est un processus dans lequel les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (CSH) s'auto-prolifèrent et se différencient en tous les types de cellules sanguines. Le processus se déroule dans la moelle des os plats chez les adultes (Jankowski et al., 2018).

L'hématopoïèse décrit les étapes successives de la prolifération et de la différenciation de ces cellules souches multipotente, engendrant plusieurs générations de progénitures et de précurseurs dont la différenciation terminale fournit les trois lignées de cellules sanguines matures : érythrocytes, leucocytes et plaquettes (Sun et al., 2014).

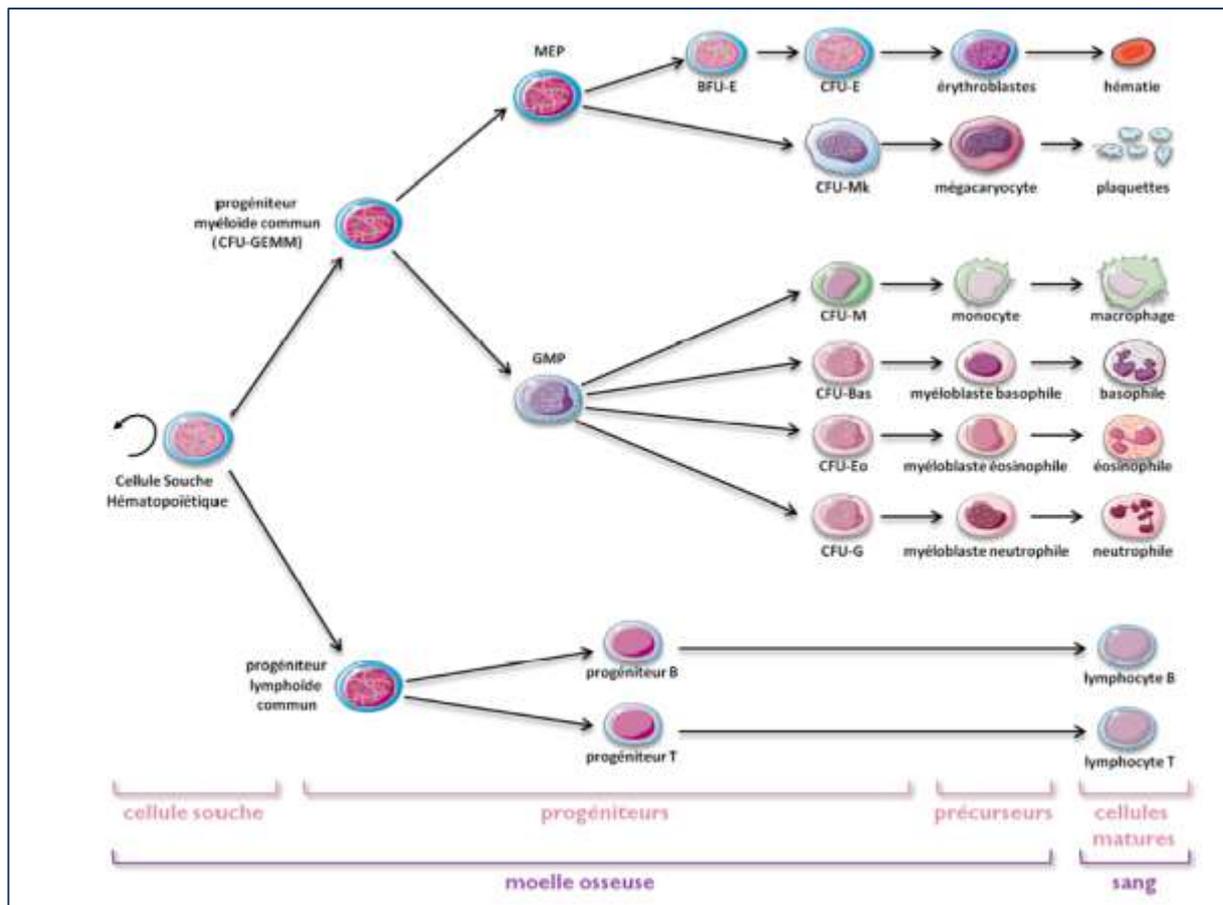


Figure 6 : Schéma de l'hématopoïèse (Descat, 2002).

La cellule souche hématopoïétique (CSH) donne naissance à une progéniture myéloïde ou lymphoïde. La progéniture lymphoïde devient progéniture B ou progéniture T, puis lymphocyte B ou lymphocyte T.

Le progéniture myéloïde se différencie en progéniture MEP ou en GMP, puis en progéniture engage vers une lignée Spécifique. On retrouve les BFU-E puis les CFU-E , CFU-Mk, CFU-M, CFU-Baso, CFU-Eo, CFU-G. Tous ces progénitures vont devenir précurseurs puis cellules matures. Les cellules matures quittent la moelle osseuse et passent dans la circulation sanguine (figure 6).

I.5.1-Érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus qui produit les érythrocytes matures au niveau de la moelle osseuse à partir des cellules souches après une série de différenciation successive et sous l'influence d'une hormone dite érythropoïétine (Suzuki *et al.*, 2015). Suite à ce phénomène qui synthétise des érythrocytes mature, on cite les diverses étapes responsables à la production de cette dernière.

L'érythropoïèse commence par les CSH où elle donne des proérythroblastes (il s'agit des grandes cellules nucléées de 20 micromètre de diamètre), puis cette dernière se différencie en érythroblaste d'abord basophile, en polychromatophile puis en acidophile et enfin en réticulocyte connu par la condensation du noyau et son expulsion pour donner à la fin deux érythrocyte mature anucléé (Breda et Rivella, 2014).

Chapitre II

Valsartan

II.1. Généralités

Le valsartan est une substance non peptidique, actif par voie orale et bloqueur des récepteurs de l'angiotensine II spécifiques agissant sur les récepteurs AT1, Présent dans de nombreux tissus tels que le muscle lisse vasculaire et la glande surrénale (Hasin *et al.*, 2017).

Le valsartan est chimiquement décrit comme [(S)-N-Valéryl-N-{[2-(1H-tétrazole-5-yl)-biphényl-4-yl]-méthyl}-valine]. Sa formule brute est C₂₄H₂₉N₅O₃, et son poids moléculaire est de 435,519 gr/mol (Ashok et SHakya, 2016 ; Sung, 2012).

Il peut être utilisé pour traiter divers troubles cardiaques, notamment l'hypertension, la néphropathie diabétique et l'insuffisance cardiaque, il bloque l'action de l'angiotensine II, notamment la constriction des vaisseaux sanguins et l'activation de l'aldostérone, afin de réduire la pression artérielle (Zaid *et al.*, 2011).

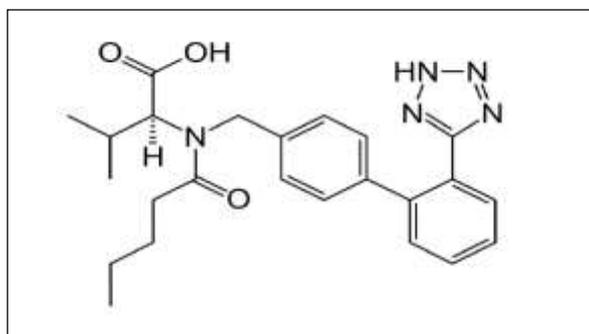


Figure 7 : La formule chimique du valsartan (Shirkhedkar *et al.*, 2017).

II.2. Les propriétés physico-chimiques de valsartan

Les critères les plus souvent évoqués sont la solubilité, la densité, ou encore le temps de demi-vie qui déterminent la mobilité et le devenir d'une molécule dans l'organisme.

Tableau 1 : Représente les propriétés physico-chimiques du valsartan.

Nom commun	Valsartan
Nom chimique	[(S)-N-valeryl-N-{{2-(1H-tertrazol-5-yl) biphenyl-4-yl}- methyl} valine](Kadam et Bari, 2007).
Classe chimique	Enantiomère (S) dérivé de la L-Valine Non hétérocyclique (Gosse et al., 1999).
Formule brute	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃ (kjeldsen et al.,2005).
masse moléculaire (g /mol)	435,5(kjeldsen et al., 2005).
Etat physique	se présente sous forme de Poudre cristalline blanche, solide (Siddiqui et al., 2011).
Densité (g/cm ³)	1.2 g/cm ³ (Siddiqui et al., 2011).
Durée de demi-vie	Inhibe de manière sélective le récepteur AT1avec une demi-vie allant de 6 à 9h (Saydam et al., 2007).
Température de fusion	105-110°C (Saydam et al., 2007).
Solubilité	Soluble dans l'éthanol, méthanol et insoluble dans l'eau (Siddiqui et al., 2011).

II.3. Pharmacocinétique

Les concentrations plasmatiques maximales de valsartan sont atteintes dans les 2 à 4 heures qui suivent l'administration orale du médicament en monothérapie. La biodisponibilité absolue moyenne du valsartan est d'environ 23 %, mais elle varie largement (Monographie de produit, 2019).

Le valsartan se lie aux protéines sériques, principalement à l'albumine, dans des proportions variant de 94 à 97 %. Après administration intraveineuse, le volume de distribution du valsartan à l'état d'équilibre est d'environ 17 L, ce qui veut dire que la répartition du valsartan dans les tissus n'est pas très étendue (Monographie de produit, 2019).

Le valsartan ne subit pas de biotransformation importante : seulement environ 20 % de la dose est récupérée sous forme de métabolites. Un métabolite de type hydroxy a été détecté dans le plasma à de faibles concentrations (moins de 10 % de la valeur de l'ASC du valsartan). Ce métabolite est considéré comme inactif sur le plan pharmacologique.

Le système du cytochrome P450 semble intervenir dans la biotransformation du valsartan (Monographie de produit, 2019).

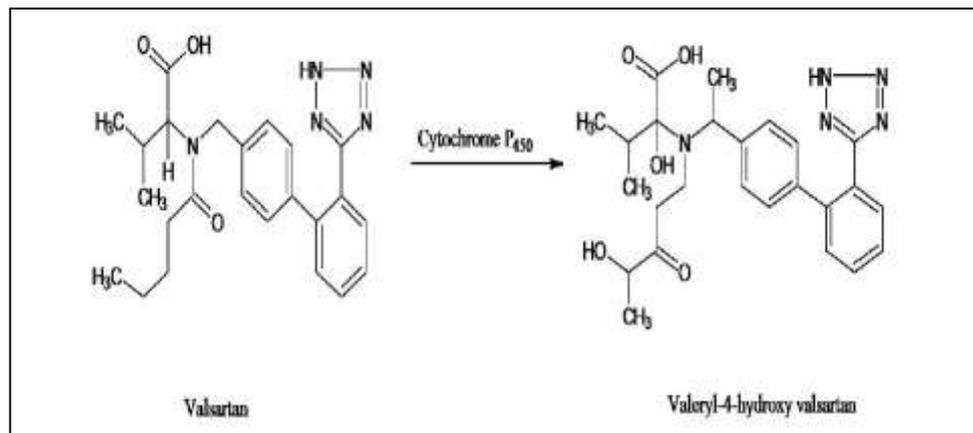


Figure 8 : Métabolisation de valsartan en valeryl-4-hydroxy VAL (Shirkhedkar *et al.*, 2017).

Le valsartan est principalement éliminé dans les fèces (environ 70 % de la dose) et dans les urines (environ 13 % de la dose), essentiellement sous forme inchangée. La demi-vie plasmatique apparente est de 6 à 9 heures (Gosse *et al.*, 1999).

II.4. Pharmacodynamique

Le valsartan est un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, ce qui signifie qu'il bloque l'action d'une hormone appelée angiotensine II (Amah et Thuillez, 2007).

L'angiotensine II est un vasoconstricteur puissant (une substance qui diminue le diamètre des vaisseaux sanguins). En bloquant les récepteurs sur lequel l'angiotensine II se fixe normalement, le valsartan met fin à l'action de l'hormone (figure 9), ce qui permet aux vaisseaux sanguins de s'élargir et entraîne une diminution de la pression artérielle (Olivier et Pascale, 2005).

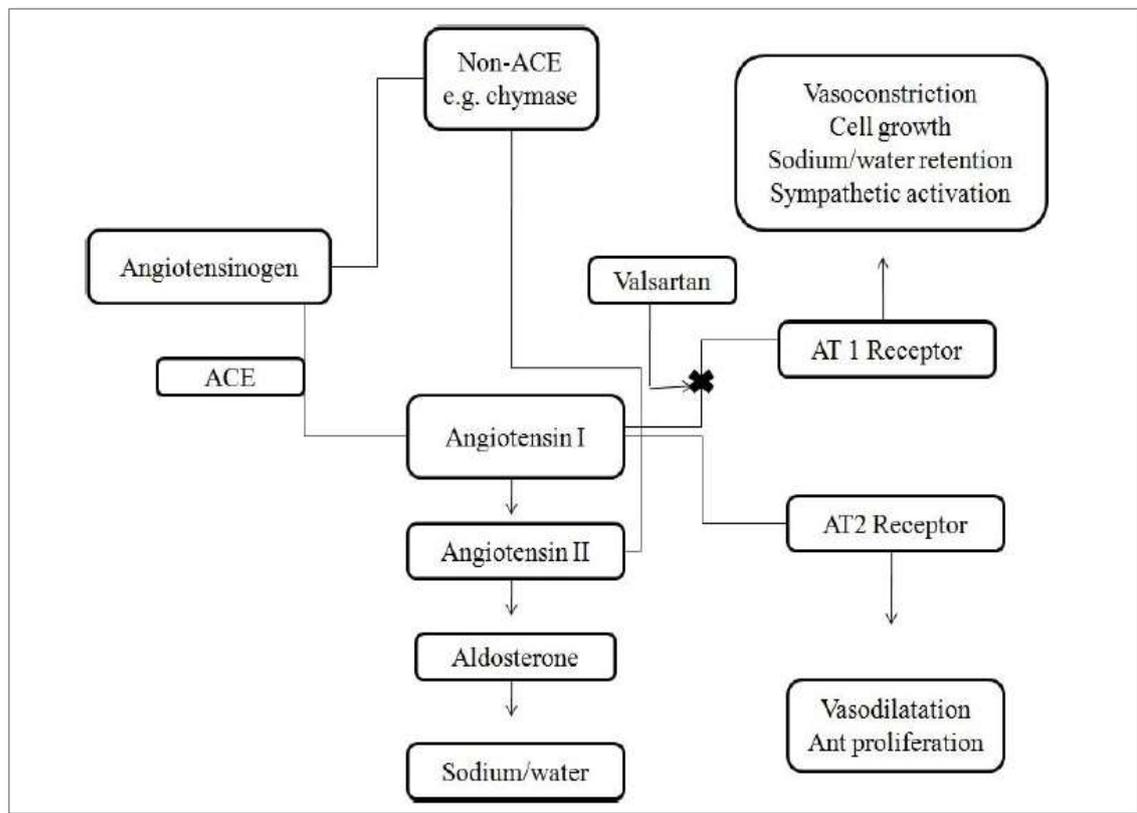


Figure 9 : Le mécanisme d'action de valsartan (Shirkhedkar *et al.*, 2017).

II.5. Effet indésirables

Lors des études cliniques, le valsartan est utilisé à des doses de 20 à 320 mg/jour et donne un taux d'effets indésirables sans différence significative par rapport au placebo. Les effets indésirables rencontrés sont des céphalées, des vertiges, des infections virales, des infections des voies respiratoires supérieures et de la toux (Gosse *et al.*, 1999).

Les plus fréquents sont l'hyperkaliémie, les hypotensions orthostatiques, les hypotensions brutales en cas de déplétion hydrosodée préalable, et les réactions d'angioedème (Vidal, 2012).

II.6. La toxicité aiguë et chronique

Dans le cadre d'études précliniques visant à évaluer l'innocuité du valsartan, des tests de toxicité aiguë en administrant une dose forte unique (de 100mg/kg ou 2000mg/kg), et des tests de toxicité chronique en administrant chez des rats des fortes doses du médicament (de 200 à 600 mg/kg de poids corporel) pendant une longue durée.

Les résultats des deux tests sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 02 : Représente les résultats du test de la toxicité aigüe (Monographie de produit, 2019).

Voie d'administration	Dose (mg/kg)	Observations principales
Gavage	100	Aucun effet indésirable observé.
Gavage	1000, 2000	2000 mg/kg : diarrhée, présence d'une substance blanche (Similaire à la substance utilisée dans le cadre de l'épreuve) dans les fèces. DL50 approximative > 2000 mg/kg.

Tableau 3 : Représente les résultats du test de la toxicité chronique (Monographie de produit, 2019)

Dure de traitement	Voie d'administration	Dose (mg/kg)	Observations principales
Gavage	14 jours	60, 200, 600	Groupe ayant reçu les doses moyenne ou élevée : ↑ de l'urée. DSEO = 60 mg/kg.
Gavage	91 jours	60, 200, 600	Groupe ayant reçu les doses moyenne ou élevée : ↑ de l'urée. Groupe ayant reçu la dose élevée : hyperplasie des tubes rénaux, hypertrophie de l'artériole glomérulaire ; anémie avec réponse régénératrice. DSEO = 60 mg/kg.
Gavage	12 mois	20, 60, 200	Groupe ayant reçu la dose moyenne : ↑ de l'urée à 60 mg/kg. Groupe ayant reçu la dose élevée : anémie et hypertrophie de l'artériole glomérulaire. DSEIO = 20 mg/kg.

Etude
expérimentale

Matériels
Et
Méthodes

Le présent travail est effectué au niveau de Laboratoire de Toxicologie Moléculaire (LTM), Université de Jijel, Algérie. Cette étude s'intéresse à l'évaluation de la génotoxicité et le stress oxydant induits par une forte dose de Valsartan ; un antagoniste de l'angiotensine II chez les souris Swiss nmri.

I. Matériel

I.1. Valsartan

Le Valsartan, matière première N° de lot 16Bp 101, nous a été fourni par le LTM sous forme d'une poudre très fine d'une couleur blanche, Il est dissous ou mis en suspension dans un véhicule approprié (éthanol/eau).

I.2. Cyclophosphamide

Il s'agit du cyclophosphamide monohydrate ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$), CSA : 6055-19-2. Lot SLBG4216V, SIGMA. Nous a été fourni par le LTM sous forme de poudre blanche très fine dissoute dans l'eau distillée.

I.4. Matériel biologique et condition d'élevage

Les expériences sont réalisées sur 18 souris mâles Swiss nmri, fournis par l'institut Pasteur d'Alger, pesant entre 20,8g et 37,7g. Les animaux sont maintenus dans des cages en polypropylène, avec libre accès à la nourriture et à l'eau. L'animalerie est soumise à une température entre 20 et 27°C et une photopériode de 12/24 h.

I.5. Répartition et traitement des animaux

Les souris sont réparties en 3 groupes :

-  **Le 1^{er} groupe** (n=6) : témoin négatif (6souris) recevant 0,2ml de véhicule (éthanol 1%/eau) par gavage une fois par jour pendant deux jours. (T-)
-  **Le 2^{ème} groupe** (n=5) : Témoin positif, traité par 0,2ml de Cyclophosphamide (dose unique 40mg/kg), par voie intra péritonéale. (T+)
-  **Le 3^{ème} groupe** (n=7) : (FD) reçoit 0,2ml de Valsartan par gavage à la dose 2600mg/Kg une fois par jour pendant deux jours.

Le choix des doses de valsartan et de cyclophosphamide est adapté selon le protocole expérimental décrit dans la ligne directrice de l'OCDE (OCDE, 2019).

I.6. Sacrifice et prélèvement des organes

À la fin du traitement (24 à 36h) les souris sont décapitées, le sang recueilli dans des tubes héparinés, afin de réaliser le test de micronoyaux.

La paroi abdominale est ouverte le rein et le foie de toutes les souris sont soigneusement prélevés, plongés et lavés dans l'eau physiologique (0,9%) pour éliminer le sang, des fractions destinées aux dosages des paramètres du stress oxydatif sont maintenues à (-20 °C), et les fractions destinées à l'étude histologique sont conservées dans une solution de formol tamponné 10%.

II. Méthodes

II. 1. Test de micronoyaux dans le sang périphérique

II.1.1. Principe

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique (OCDE, 2016).

La préparation et la coloration des cellules du sang périphérique pour le test de micronoyaux sont traitées selon le même procédé que celui utilisé pour les échantillons de moelle osseuse selon une procédure normalisée basée sur celle de Shmid (1975) et Mavournin *et al* (1990).

La visualisation ou la détection des micronoyaux est facilitée dans ces cellules car elles ne possèdent pas de noyau principal. Une augmentation de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est une indication de la présence d'une aberration chromosomique structurelle ou numérique induite (OCDE, 2016).

II.1.2. Mode opératoire

Toutes les lames et échantillons, y compris ceux des témoins positifs et négatifs, doivent être codés individuellement avant tous types d'analyse.

L'étalement du sang est réalisé selon la technique classique du frottis sanguin. Une goutte de sang a été déposée à une extrémité d'une lame de verre propre et dégraissée. On utilise ensuite une autre lame ou une lamelle, qu'on approche juste devant la goutte, en respectant un angle d'inclinaison de 30 degrés avec la première lame. La goutte va alors se répandre le long de la jonction entre les deux lames, on étale la goutte de sang vers l'autre extrémité de la lame support.

Le frottis doit être ensuite rapidement séché à l'air pendant une demi-heure au moins. Il existe de nombreuses techniques de coloration, dont la plus connue est la coloration de May-Grünwald-Giemsa (Mirtuka *et al.*, 1977).

Nous avons utilisé le KIT RAL 555 (Ref. 361550); Une variante rapide de la coloration de May-Grünwald Giemsa. La sensibilité, la lecture et l'interprétation de la coloration du kit RAL 555 sont identiques à celles des colorations classiques (Bracia, 2007).

II.1.3. Lecture

Le micronoyau apparaît dans les érythrocytes dans le sang circulant ou dans les érythroblastes dans la moelle osseuse comme une petite masse colorée en violet (après coloration MGG).

Les lames sont observées au microscope optique (objectif à immersion, grossissement x 1000). Pour chaque animal, on détermine la proportion d'érythrocytes immatures dans le nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) en comptant au moins 500 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 2000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (Gollapudi et McFadden, 1995), selon les critères suivants

- le micronoyau ne touche pas le noyau principal,
- sa coloration est identique à celle du noyau,
- son diamètre est inférieur à $r/3$ de celui du noyau.

II.2. Dosage tissulaire

II.2.1. Préparation de la fraction cytosolique

Nous avons préparé la fraction cytosolique selon la méthode décrite par Iqbal *et al.* (2003). Pour cela 1g du tissu est homogénéisé par un homogénéiseur de DOUNCE avec 3 volumes d'une solution tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0,1M, pH 7,4) contenant KCL (1,17%).

L'homogénat obtenu est centrifugé pendant 15 minutes, à 2000 rpm et à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse pour séparer les débris cellulaires, le surnageant obtenu est centrifugé pendant 30 minutes, à 9600 rpm et à 4°C. Le surnageant final est utilisé pour réaliser les différents dosages tissulaires.

II.2.2. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976). Elle est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à 590nm, après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la solution. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié à la concentration en protéines dans l'échantillon.

Pour cela, 2ml de Bleu de Coomassie sont ajoutés à 5 μ l de l'échantillon dilué à 1/10^{ème}. Ensuite le mélange est incubé à température ambiante pendant 15minutes à l'obscurité. La lecture des densités optique se fait à 590nm.

La concentration en protéines est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions par la BSA. Les résultats sont exprimés en mg/ml de BSA.

II.2.3. Dosage du MDA cytosolique

La quantité du MDA est évaluée selon la méthode (Okhawa *et al.*, 1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) d'un pigment coloré en rose entre le MDA et l'acide

thiobarbiturique (TBA), absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

A 0,5 ml de la fraction cytosolique nous avons ajouté 0,5ml de TCA (20%) et 1ml de TBA (0,67 %). Ensuite nous avons chauffé le mélange à 100°C pendant 15 min, refroidis puis additionné 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm.

Nous avons calculé la concentration de MDA selon la loi de Beer Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire, du complexe MDA-TBA $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buege et Aust, 1978). Le taux de MDA cytosolique est exprimé en nmole de MDA libéré par mg de protéine.

II.2.4. Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le GSH est dosé par la méthode colorimétrique par le réactif d'ELLMAN (1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithio-bis 2 nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm, selon la réaction suivante :



Pour cela 50 μ l de TCA (5%) sont ajoutés à 50 μ l de la fraction cytosolique. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 3000rpm à 4°C. 20 μ l du surnageant sont ensuite dilués dans 5ml de tampon phosphate (0,1M, Ph=8). 20 μ l du DTNB (0,001M) sont ajoutés à 3ml du mélange de dilution, après 15 minutes d'incubation la lecture de la densité optique se fait à 412nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions.

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en Mm/mg de protéines.

II.3. Dosage de l'activité des enzymes antioxydantes

II.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la catalyse (CAT)

L'activité de la CAT est déterminée selon la méthode décrite par Clairbone(1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène(H₂O₂) en présence de la source enzymatique à 25°C. Un mélange constitué de 1ml du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0,1 M, pH 7,2), 0,95 ml de peroxyde d'hydrogène (0,019 M) et 25 μ l de la fraction cytosolique est préparé. Labsrbance est mesurée à 240nm chaque minute pendant 2 minutes.

L'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéine selon la relation suivante :

$$U / g \text{ de protéine} = (2,3033/T) \cdot \log A1/A2 / \text{mg protéines}$$

T : intervalle de temps en min ; A1 : Absorbance au temps 0 mn ; A2 : Absorbance après 1 mn

II.3.2. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité du superoxyde dismutase cytosolique est effectuée selon la méthode décrite par Marklund et Marklund (1974). La mesure de l'activité de cet enzyme est basée sur la capacité du SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol.

Dans la cuve de mesure mettre : 850 µl du tampon tris HCl (50 mM, PH=8,2), 20 µl de la fraction cytosolique, 100 µl de l'EDTA (10 mM) et 50 µl de pyrogallol (2,5 mM dans HCl 10 mM). La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes.

L'activité enzymatique du superoxyde dismutase est exprimée en UI / mg de protéines selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition total (\%)} = \frac{\text{moyenne DO Blanc} - \text{moyenne DO Echantillon}}{\text{moyenne DO Blanc}} \times 100$$

$$U \text{ de SOD/mg de protéines} = \frac{\text{Inhibition total}}{n \times 50}$$

Où : n est la quantité de protéines (en milligramme) présente dans le volume de l'échantillon utilisé.

II.4. Etude histologique

La technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984) qui consiste à faire couper les échantillons en petits pièces puis les fixés dans le formol 10 % pour que les composants des tissus soient préservés.

Avant l'inclusion dans la paraffine, les fragments de tissus doivent être déshydratés par passage dans une série de bains d'alcool de concentration croissante. Les blocs de paraffine sont ensuite taillés, puis découpés en section de 5µm et colorés à l'hématoxyline/ éosine. Une coloration usuelle associant un colorant nucléaire hématoxyline et une colorante cytoplasmique éosine. Enfin, l'examen au microscope optique permet la visualisation des changements pathologiques tissulaires des tissus.

II.5. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes \pm écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes du groupe traité par le valsartan à celles du groupe témoin d'une part, et d'autre part, en comparant les moyennes du groupe traité par le cyclophosphamide à celles du groupe traité par le valsartan par le test de Student on utilisant le logiciel MINITAB.18.

- Comparaison du groupe traité par le valsartan avec le témoin négatif :

*Significatif $P < 0,05$; ** Hautement significatif $P < 0,01$; ***Très hautement significatif $P < 0,001$.

- Comparaison du groupe traité par le valsartan avec le témoin positif :

#Significatif $P < 0,05$; ##Hautement significatif $P < 0,01$; ###Très hautement significatif $P < 0,001$.

- Etude comparative du stress oxydatif hépatique et rénal

* Significatif $P < 0,05$; ** Hautement significatif $P < 0,01$; *** Très hautement significatif $P < 0,001$.

Résultats

Et

Discussion

Cette étude a pour but d'évaluer ; la génotoxicité par le test de micronoyaux dans le sang périphérique, le stress oxydatif hépatique et rénal et la visualisation des altérations tissulaires au niveau du foie et rein

I. Effet des traitements sur le taux de mortalité

Les animaux ont été suivis durant toute la période de traitement. Les résultats de taux de mortalité sont représentés dans le tableau (4).

Nous avons enregistré la perte de deux souris dans le lot traité par le valsartan, par ailleurs aucune perte n'a été signalée dans les autres lots de l'expérimentation.

Tableau 4 : Taux de mortalité (exprimé en pourcentage %) des souris de différents lots pendant la période de traitement.

	T-	T+	FD
Nbr de souris mortes/lots	0/6	0/5	2/7
Pourcentage %	0%	0%	28.57%

T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose

La mortalité des deux souris peut être expliquée soit par, l'hypotension orthostatique provoqué par la forte dose de valsartan, laquelle pourrait entraîner un niveau de conscience altéré, un collapsus circulatoire et/ou un état de choc, et/ou la tachycardie qui peuvent être des manifestations létales (Monographie de produit, 2016), ou probablement à cause de (NDMA) qui provoque de graves lésions du foie, comme des nécroses et d'ascites hémorragiques qui peuvent être létales (ATSDR et EPA, 1989).

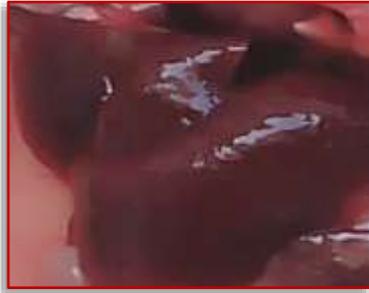
Il est aussi largement admis que la NDMA induit une fibrose hépatique et une cirrhose qui peut être sévère et défailante (Haggerty et Holsapple, 1990).

D'autres études réalisées pour des fortes doses de valsartan n'ont enregistrés aucune mortalité chez les animaux traités, en administrant des doses de 200 à 600mg/kg par gavage, pendant 91 jours (Monographie de produit, 2015).

II. Evaluation macroscopique

Les principales anomalies enregistrées à la fin du traitement et après dissection des souris sont révélées chez le groupe (FD) et le groupe (T).

Les anomalies sont illustrées dans les photographies au-dessous :



Irritation et hypertrophie hépatique (à gauche) et hypertrophie rénale (à droite) chez les souris traitées par la forte dose (2600mg/Kg) de valsartan.



Hypertrophie gastrique (à gauche) et Hypertrophie intestinale (à droite) chez les souris traitées par la forte dose (2600mg/Kg) de valsartan.



Reins polykystiques chez une souris traitée avec une dose unique (40mg/Kg) de cyclophosphamide

Photos prise chez les souris après le sacrifice.

III. Evaluation du taux de micronoyaux dans le sang périphérique

Les résultats de dénombrement des micronoyaux dans les différents lots de l'expérimentation sont présentés dans le tableau (5), exprimé en pourcentage ‰.

Nous avons remarqué une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) des pourcentages des micronoyaux chez les souris traitées par le valsartan (9,75‰) par rapport au témoin négatif (0,33‰), cependant la comparaison avec le témoin positif (12,42‰) est non significative ($p > 0,05$).

La figure 10 illustre des photos de quelques lames sur lesquelles nous avons pu visualiser les micronoyaux chez, le lot (FD), le lot (T+) en comparaison avec le groupe(T-).

Tableau 5 : Le taux des micronoyaux chez les souris de différents lots de l'expérience, exprimé en moyenne \pm écart type.

Lots	Moyenne \pm écart type
T(-)	0,33 \pm 0,17
T(+)	12,42 \pm 2,41
FD	9,75 \pm 1,50 ***. ns

*T (-) : témoin négatif ; T (+) : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; (***) désigne un effet très hautement significative ($p \leq 0,001$) en comparaison avec T(-) ; (ns) désigne un effet non significatif ($p \geq 0,05$) en comparaison avec T(+).*

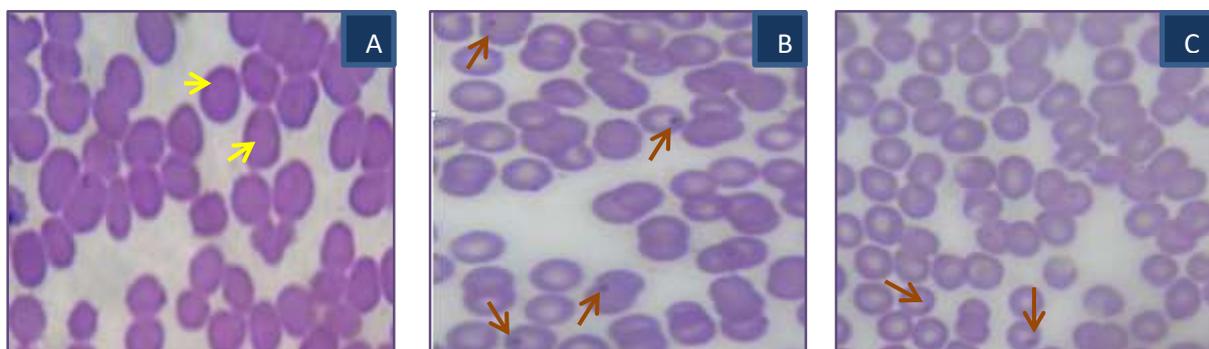


Figure 10 : Photographies des lames du test de micronoyau dans le sang périphérique des souris

T- (photo A), T+ (photo B), traités par le valsartan (photo C), après une coloration MGG (GR : $\times 100$). Flèche jaune érythrocyte sans micronoyaux et flèche brique indique l'érythrocyte micronucléé.

Le micronoyau apparaît dans les érythrocytes dans le sang circulant ou dans les érythroblastes dans la moelle osseuse comme une petite masse colorée en violet (après coloration MGG). Il témoigne de la génotoxicité du médicament.

Les micronoyaux sont constitués de chromosomes entiers perdus au cours de la mitose précédente (phénomène aneugène) ou de fragments chromosomiques acentriques exclus du noyau de la cellule fille pendant la division cellulaire (phénomène clastogènes) (Eslava, 2004).

Nos résultats montrent une augmentation de taux des micronoyaux des érythrocytes dans le sang périphérique après un traitement par le cyclophosphamide, ce qui confirme sa capacité à induire des dommages chromosomiques (Tripathi et Jena, 2009) due à son activation après métabolisme au niveau hépatique par le cytochrome P 450 (CYP 450) en générant des métabolites possédants un ou plusieurs groupements alkyles qui peuvent agir directement au niveau de l'ADN, par création des liaisons covalentes avec des groupements électro-négatifs des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (Pette *et al.*, 1995).

Il a été rapporté que le cyclophosphamide et ses métabolites ont la capacité à induire des mutations létales dominantes, des dommages à l'ADN et la génération de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) *in vivo*. En raison de leur forte réactivité chimique, les radicaux libres induisent des dommages cellulaires de nombreuses manières (Arif *et al.*, 2009). Les effets les plus néfastes des radicaux libres du cyclophosphamide *in vivo* ont été les activités génotoxiques, y compris les dommages à l'ADN, les aberrations chromosomiques, les échanges de chromatides sœurs et les mutations géniques, pouvant conduire à un certain nombre d'affections pathologiques, notamment le cancer (Abdella, 2012).

D'autres études ont montré que l'administration intrapéritonéale de cyclophosphamide pouvait entraîner une augmentation des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs (SCE) (Barton *et al.*, 2003 ; Murata *et al.*, 2004).

Rehman et ces collaborateurs, (2012) ont confirmé également la génotoxicité de cyclophosphamide après administration d'une injection unique de médicament par voie intrapéritonéale (ip) à 50 mg/kg de poids corporel chez des souris albinos suisses.

Le traitement par le valsartan à forte dose (2600 mg/kg) a également donné un résultat positif pour le test de micronoyaux (un taux élevé de micronoyaux dans les érythrocytes).

A ce jour, aucun travail n'a montré la génotoxicité de valsartan qui est connu pour être excrété en grande partie sous forme de composé inchangé et est métabolisé de manière minimale dans les microsomes du foie par l'intermédiaire de cytochrome P2C9 (CYP2C9), qui est la seule forme responsable de la 4-hydroxylation du valsartan, en donnant un seul métabolite inactif, le 4-hydroxyvaléryle (4-OH valsartan) (Nakashima *et al.*, 2005).

D'ailleurs il existe une abondance de preuves démontrant le pouvoir mutagène et clastogène de la NDMA (CIRC, 1978 ; ATSDR, 1989), l'impureté découverte dans la matière première du valsartan.

Bien que nous ne disposions d'aucune référence pour pouvoir expliquer ce taux élevé de micronoyaux, néanmoins nous pouvons l'expliquer probablement par, la capacité de N-Nitrosodiméthylamine à méthyler les sites nucléophiles de macromolécules cellulaires telles que l'ADN en provoquant des effets clastogène (Fournier, 1990).

La génotoxicité de la NDMA a été constamment démontrée dans de nombreuses études *in vitro* sur des systèmes non humains. Des études *in vivo* ont montré que la NDMA méthyle l'ADN, provoque la fragmentation de l'ADN et induit la synthèse et la réparation de l'ADN dans le foie et d'autres tissus d'espèces variées. La NDMA induit des aberrations chromosomiques, des échanges de chromatides sœurs et des micronoyaux. Ces effets génotoxiques sont survenus après une inhalation, une administration orale ou intrapéritonéale de NDMA (Ikeuchi et Sasaki, 1981 ; Abe et Sasaki, 1982 ; Bermudez *et al.*, 1982 ; Bamborschke *et al.*, 1983).

IV. Evaluation du stress oxydatif tissulaire hépatique et rénale

IV.1. Variation du taux de MDA

Les espèces réactives oxygénées (ERO) peuvent générer des atteintes importantes dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles telles que protéines, lipides et acide nucléiques (Cadenas et Davidies, 2000).

Il est clairement démontré aujourd'hui que les radicaux libres sont responsables de processus toxiques (Lahouel *et al.*, 2004).

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona *et al.*, 2000). Parmi les marqueurs d'évaluation de la peroxydation lipidique, le dialdéhyde malonique (MDA) qui est sans doute le plus connu et le plus utilisé (Guichardant *et al.*, 2006). La quantification de ce dernier est généralement considéré comme un indicateur du stress oxydatif résultant d'une superproduction des ROS et de la diminution des défenses antioxydantes (Servais, 2004).

Les variations des concentrations de MDA cytosolique hépatique, après différents traitements par sont présentés dans la figure (11).

Pour le taux du MDA cytosolique rénale, d'après la figure (11) nous constatons une augmentation non significative ($p > 0,05$) chez les souris traité par le valsartan

(0.999 ± 0.164 nmol/mg de protéine) par rapport aux souris témoins (0.505 ± 0.046 nmol/mg de protéine), d'autre part une augmentation significative ($p < 0,05$) a été observé chez les souris traité par le valsartan par rapport à celle des souris traité par le cyclophosphamide (0.999 ± 0.164 contre 0.262 ± 0.101 nmol/mg de protéine).

Pour le taux du MDA hépatique, l'élévation est hautement significative ($p < 0,01$) chez le groupe traitées par le valsartan (2.066 ± 0.10) contre un témoin (1.129 ± 0.15), d'autre part une diminution non significative ($p > 0,05$) observé chez le groupe recevant le cyclophosphamide (1.89 ± 0.3 nmol/mg de protéine) par rapport aux souris traitées par le valsartan.

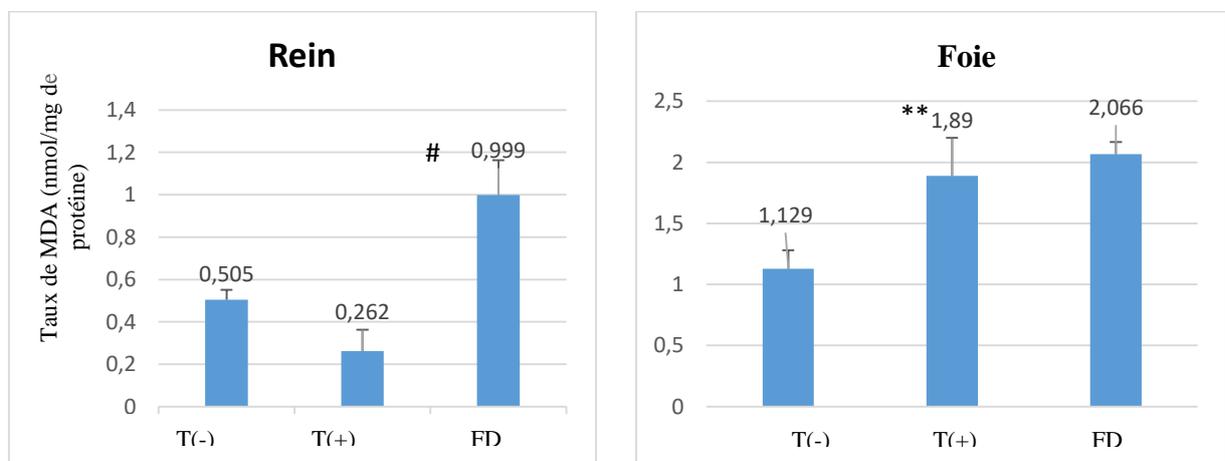


Figure 11 : Variation du taux cytosolique du MDA hépatique et rénale.

T(-): témoin négatif ; *T(+)* : témoin positif traité par le cyclophosphamide; *FD* : groupe traité par le valsartan à forte dose ; (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$) en comparaison avec *T(-)*, (#) désigne un effet significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec *T(+)*.

L'augmentation du taux cytosolique en MDA après un traitement par la cyclophosphamide peut être expliquée par une forte induction d'une peroxydation lipidique par les radicaux libre dans le tissu hépatique (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003).

Durant le métabolisme du cyclophosphamide et la dégradation de ses métabolites par les enzymes hépatiques, notamment les cytochromes CYP3A4, CYP2C9 et la CYP2B6, il y aura une production excessive de radicaux libres oxygénés (ROS) (De jonge *et al.*, 2005). Ces ROS peuvent réagir avec différents composants de la cellule. Parmi les dommages qui résultent de cette interaction : la peroxydation lipidique.

En effet, le principal métabolite de cyclophosphamide est le 4-hydroxy cyclophosphamide (4-OHCP) responsable de l'induction la peroxydation lipidique dans différents tissus y compris le foie (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003).

Nos résultats montrent que l'administration de valsartan provoque une peroxydation lipidique accrue expliquée par le taux élevé du MDA cytosolique trouvé chez les souris traitées par une forte dose de 2600mg/kg,

Le valsartan est métabolisé dans les microsomes du foie par l'intermédiaire de cytochrome P2C9 (CYP2C9), et donnant un seul métabolite inactif, le 4-hydroxyvaléryle (4-OH valsartan) (Nakashima *et al.*, 2005). Alors que NDMA (l'impureté de valsartan) est métabolisée soit par l'alpha-hydroxylation soit par la dénitrosation de la nitrosamine. On considère que les deux voies passent par un radical intermédiaire commun $[CH_3 (CH_2.) NBN=O]$ généré par l'action du système oxydase à fonction mixte dépendant du cytochrome est probablement induit un peroxydation lipidique au niveau de foie 2E1 (Haggerty et Holsapple, 1990 ; Lee *et al.*, 2006).

Ces résultats diffèrent par rapport à ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont trouvés que le valsartan a un effet bénéfique sur le stress oxydatif et la diminution de taux de MDA cytosolique. Il faut noter que ces auteurs ont utilisé des doses thérapeutiques (10 à 20 mg/kg) pendant 30 jours (Liu *et al.*, 2018).

IV.2. Variation de GSH

Une autre indication en faveur du processus oxydatif est représentée par le réserve cellulaire en antioxydants en particulier le glutathion. Ce dernier est l'agent antioxydant non-enzymatique intracellulaire principal qui joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques (Chakraborty *et al.*, 2009).

Les résultats de variations des concentrations de GSH cytosolique hépatique et rénale, après différents traitements par le valsartan par rapport au groupe témoin négatif et groupe témoin positif sont présentés dans la figure (12).

Nous avons enregistré une diminution non significative ($P>0.05$) de taux de GSH rénale chez les souris traitées par le valsartan par rapport au T(-) (0.019 ± 0.000329 contre 0.021 ± 0.000894 nmol/mg de protéine). De même le taux de GSH décroît de façon non significative ($P>0.05$) chez les souris traité par le valsartan par rapport aux souris traitées par le cyclophosphamide (T+) (0.01907 ± 0.00033 nM/mg de protéine).

Pour le GSH hépatique, les résultats ont montré une diminution non significative ($p>0.05$) chez les souris traitées par la (FD) par comparaison avec les souris T(-) (0.0331 ± 0.0136 contre 0.0558 ± 0.0202 nM/mg de protéine). De même il y a eu une diminution non significative ($p>0.05$) chez le (FD) par rapport aux T(+) (0.0331 ± 0.0136 nM/mg de protéine).

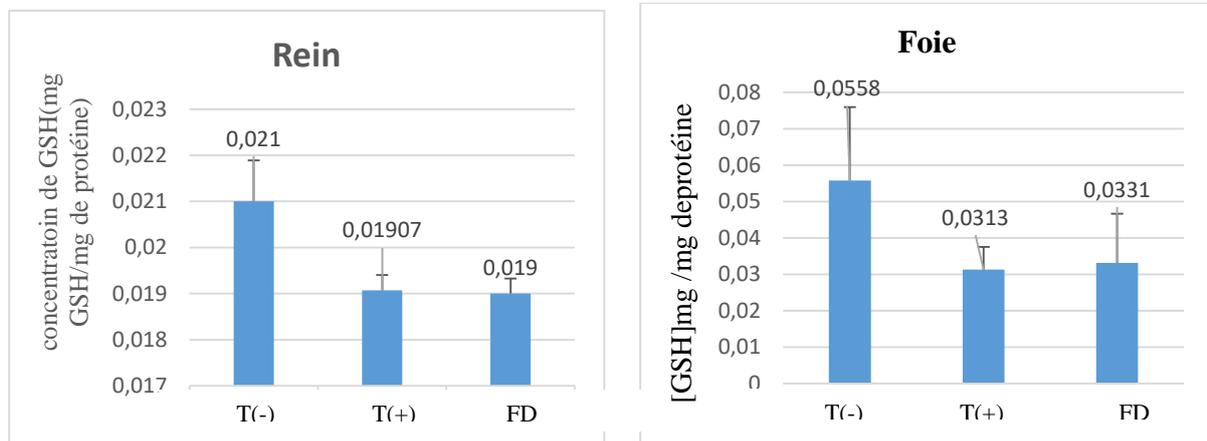


Figure 12 : Variation de l'activité cytosolique de GSH hépatiques et rénale.

T(-): témoin négatif ; *T(+)* : témoin positif traité par le cyclophosphamide; *FD* : groupe traité par le valsartan à forte dose.

Le cyclophosphamide induit une déplétion du GSH qui peut être due à son oxydation par les ROS ou par la formation des liaisons avec ses métabolites. Les liaisons entre l'acroléine (métabolite du CP) et le GSH ont un effet toxique (Singh *et al.*, 2014). L'acroléine peut exercer son effet cytotoxique sur les hépatocytes par la réduction du GSH intracellulaire en inhibant le glutathion-S-transférase hépatique ainsi qu'à la diminution des capacités antioxydantes de la cellule conduisant à l'accumulation de l'acroléine dans le foie (De Jonge *et al.*, 2005).

IV.3. Evaluation des enzymes antioxydantes (CAT et SOD)

Les enzymes antioxydantes (SOD et CAT) limitent les effets des molécules oxydantes dans les tissus et jouent un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant piègeurs de radicaux libres (Gutteridge., 1995).

IV.3.1. Variation de la CAT

Les résultats de variations des concentrations de CAT cytosolique rénale et hépatique, après différents traitements par le valsartan par rapport au groupe témoin négatif et au groupe témoin positif sont présentés dans la figure (13).

Dans cette présente étude le résultat montre une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité enzymatique de la catalase rénale chez les souris traitées par le valsartan (7 ± 0 UI/mg de protéines) par rapport aux souris témoins négatifs ($17,7 \pm 2,73$ UI/mg de protéines).

Par contre nous constatons une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de CAT chez les souris traitées par le cyclophosphamide ($8,7 \pm 0,33$ UI/mg de protéines), par rapport aux souris traitées par le valsartan.

Au niveau hépatique nous signalons une diminution non significative ($p > 0,05$) chez les souris traitées par le valsartan ($2,07 \pm 1,1$ UI/mg de protéines) par rapport aux souris témoins négatifs ($3,75 \pm 0,63$ UI/mg de protéines), également les souris traitées par la cyclophosphamide ont montré une diminution non significative ($p > 0,05$) ($1,96 \pm 0,35$ UI/mg de protéines) par rapport aux souris traité par le valsartan.

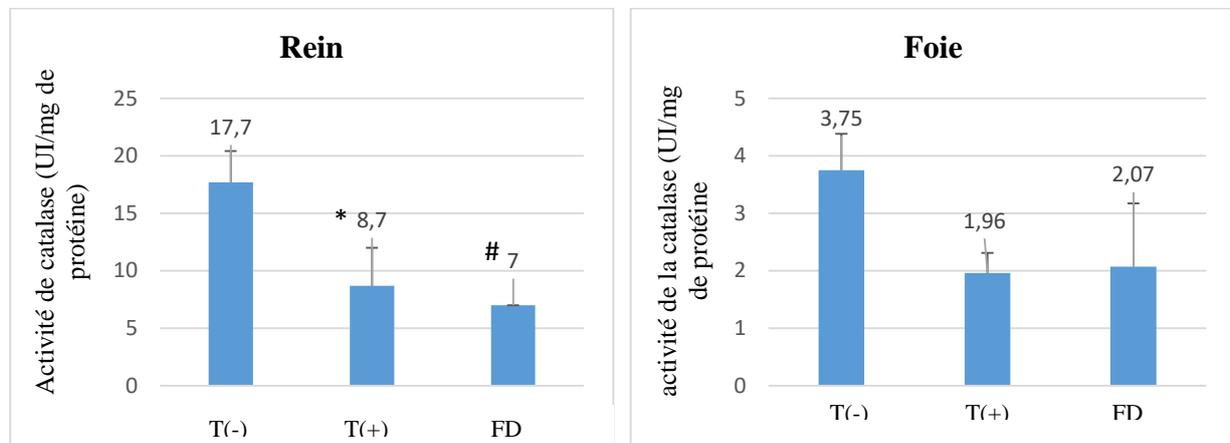


Figure 13 : Variation de L'activité de la CAT hépatique et rénale des souris traitées.

*T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; * désigne un effet significatif ($P < 0,05$) par rapport au T(-) ; # désigne un effet significatif ($p < 0,05$) par rapport au T(+).*

IV.3.2. Variation de l'activité enzymatique de la SOD

Les résultats de variations des concentrations de SOD cytosolique rénale et hépatique, après différents traitements par le valsartan, par rapport au groupe témoin négatif et groupe témoin positif sont présentés dans la figure (14)

Au niveau rénale, nos résultats montrent une déplétion hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité enzymatique rénale de la SOD chez les souris traitées par le valsartan ($11,67 \pm 3,6$ UI/mg de protéines) par rapport aux souris témoins négatifs ($96,5 \pm 25,8$ UI/mg de protéines), par

d'autre coté nous constatons une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité de cette enzyme par rapport aux souris traitées par le cyclophosphamide ($28,5 \pm 6,02$ UI/mg de protéines).

Au niveau hépatique l'activité de la SOD est diminuée chez les souris traitées par le valsartan ($7,32 \pm 0,9$ UI/mg de protéines) de façon significative ($p < 0,05$) par rapport aux souris témoins ($12,35 \pm 1,11$ UI/mg de protéines). par ailleurs l'activité de la SOD est diminuée non significativement ($p > 0,05$) chez les souris traité par le valsartan par rapport aux souris traité par le cyclophosphamide ($7,32 \pm 0,9$ contre $8,915 \pm 0,635$ UI/mg de protéines).

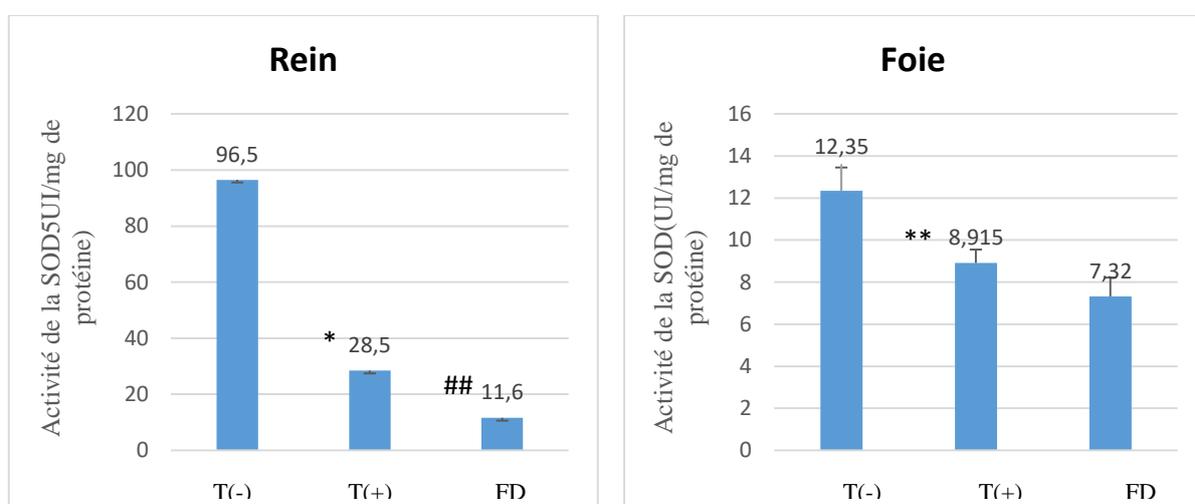


Figure 14 : Variation de l'activité enzymatique de la SOD hépatique et rénale des souris traitées.

*T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose (**)* désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$) en comparaison avec *T (-)* ; *(##)* désigne un effet significative ($p < 0,05$) par rapport au *T(+)*.

L'injection de cyclophosphamide aux souris entraîne une diminution de la concentration de la SOD et la CAT, expliqué par l'inhibition de la synthèse enzymatique par le CP ou son métabolite et / ou à l'effet indirect du peroxyde d'hydrogène (Tripathi et Jena, 2009). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003 ; Abraham *et al.*, 2009 ; Valko *et al.*, 2006).

Le traitement par le valsartan montre une diminution de l'activité enzymatique de la CAT et de la SOD hépatique. Cette diminution est due probablement à une saturation des enzymes par les ROS,

son inhibition, la destruction de ces enzymes suite au stress cellulaire induit par les métabolites toxiques de NDMA ou encore suite à son oxydation par les ERO.

V. Etude comparative entre la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité

Les résultats exposés dans le tableau (6) expriment les variations des paramètres du stress oxydatif au niveau du foie et rein après l'administration de 2600mg/Kg de valsartan pendant deux jours, c'est-à-dire que la comparaison est faite seulement entre les lots recevant le valsartan, ceci pour évaluer lequel des deux organes est plus touché par la toxicité de ce médicament.

Pour le taux de MDA

Nous remarquons que chez les souris traitées par le valsartan la peroxydation lipidique hépatique augmente de manière significative ($p \leq 0.01$) par rapport la peroxydation lipidique rénale (2.066 ± 0.104 contre 0.999 ± 0.164 nMI/mg de protéine).

Pour le taux de GSH

Nous avons constaté que chez les souris traitées par le valsartan une diminution non significative de taux de GSH cytosolique hépatique par rapporte ou taux de GSH rénale (0.0294 ± 0.0121 contre 0.1877 ± 0.0041)

Pour l'activité du SOD

Nous avons enregistré que chez les souris traitées par le valsartan une diminution non significative de taux de SOD cytosolique hépatique ($p > 0,05$) par rapporte ou taux de SOD rénale ($11,63 \pm 3,65$ contre $7.32 \pm 0,9$).

Pour l'activité de CAT

Nous avons montré que chez les souris traitées par le valsartan une diminution significative de taux de CAT cytosolique hépatique ($p < 0,05$) par rapporte ou taux de CAT rénale (2.07 ± 1.06 contre 7 ± 0).

Tableau 6 : comparaison de la variation des paramètres de stress oxydatif hépatique et rénale après administration de 2600mg/Kg de valsartan par gavage pendant deux jours.

	MDA nmol/mg de protéine	GSH mg GSH/mg de protéine	CAT UI/mg de protéine	SOD UI/mg de protéine
Foie	$2,06 \pm 0,1^*$	$0,33 \pm 0,01^{ns}$	$2,07 \pm 1,07^*$	$7,32 \pm 0,9^{ns}$
Rein	$0,99 \pm 0,14$	$0,019 \pm 0,003$	7 ± 0	$11,36 \pm 3,6$

V. Variation histologique hépatique et rénale

Le stress oxydatif hépatique et rénale enregistrés dans cette étude est confirmé par l'étude histologique des deux tissus.

Le foie du témoin négatif est de structure normale (figure15, A). Une désorganisation sévère des lames hépatocellulaire et dégénérescence des hépatocytes ainsi que la dilatation des sinusoides dans le foie du groupe témoin positif (figure15, B).

Le foie des souris traitées par le valsartan montre une dilatation de veines Centro-lobulaires (figure 15 C₁), une hémorragie légère avec vacuolisation (figure15 C₂, C₃), ainsi qu'une dilatation des sinusoides (figure 15, C₂) et l'apparition des double noyaux (figure 15, C₁, C₃).

L'observation microscopique des coupes histologiques rénales des souris du groupe témoin a montré un parenchyme rénal normal avec des glomérules de taille normale et des tubules rénaux bien définis (figure 16 A)

L'aspect histopathologique rénale de souris exposées au cyclophosphamide révèle plusieurs anomalies, nous notons : Un gonflement (sweelling) des glomérules (Figure16 B₁) caractérisé par la disparition de l'espace de Bowman résultat de l'augmentation de cellules mesangiales et des cellules endothéliales, il peut s'agir d'une hyperplasie. Le gonflement touche aussi les cellules épithéliales entourant les tubules avec une sévère hémorragie (figure 16 B₂) ainsi qu'une dégénérescence glomérulaire.

Chez les souris traitées par le valsartan (figure 16 C), l'évaluation histologique montre des modifications minimales par rapport au groupe témoin, nous observons quelques glomérules gonflés (absence de l'espace de Bowman) et tubules distaux et proximaux de taille normale Avec présence d'hémorragie.

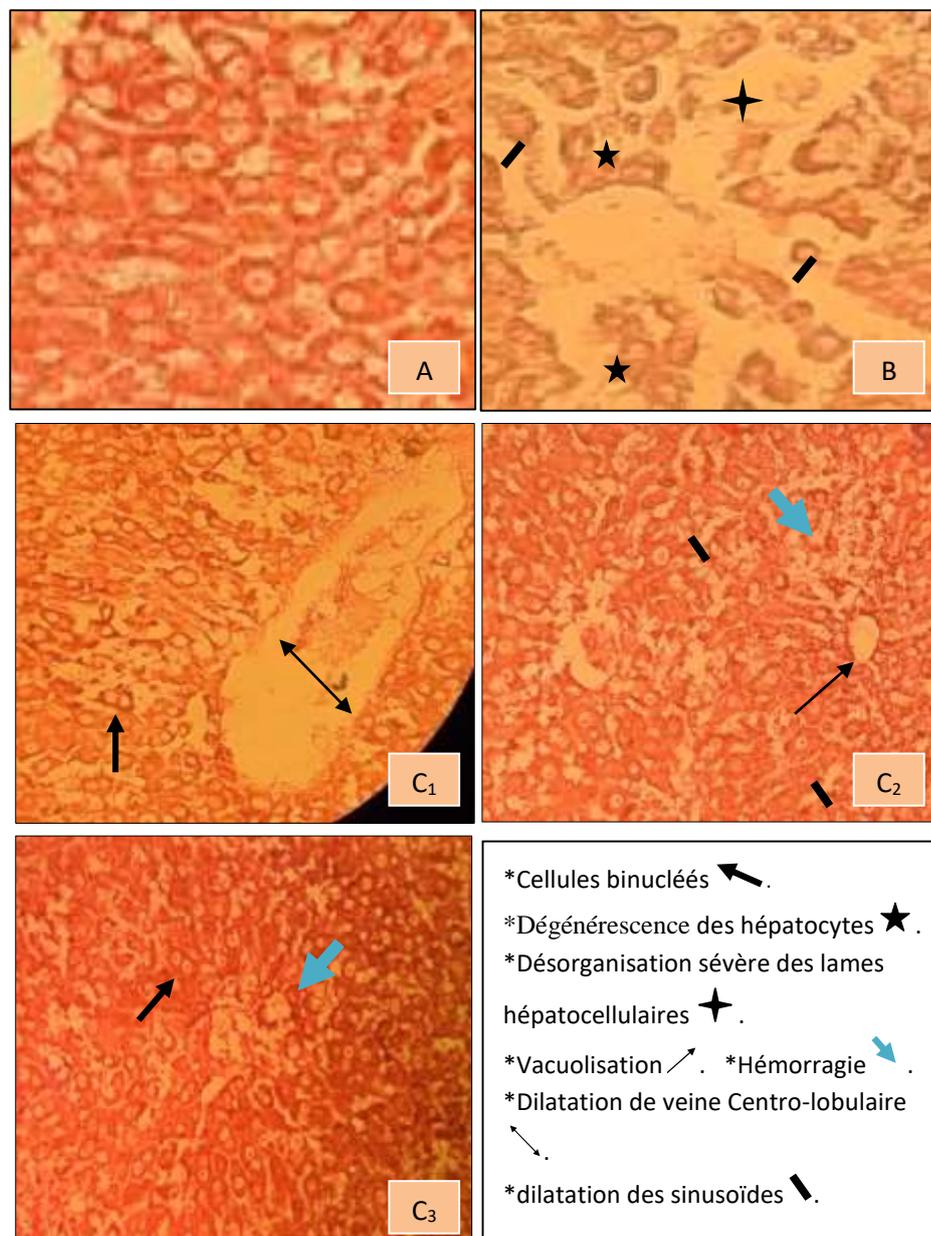


Figure 15 : Coupes histologiques du foie des lots témoin négatif (photos A), témoin positif (photo B), traité par valsartan (photos C₁, C₂, et C₃), après coloration à l' H&E (GR × 40).

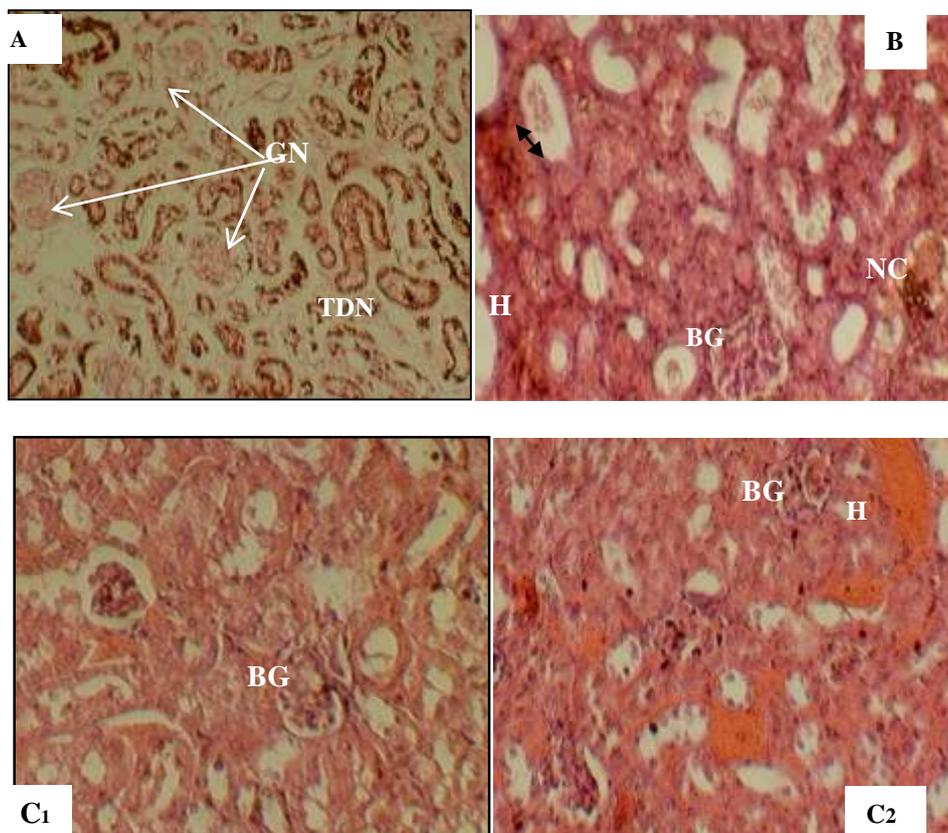


Figure16 : Coupes histologiques des reins des groupes Témoin négatif (A), souris traitées par la cyclophosphamide (B), souris traité par le valsartan (C), après coloration à l' H&E (GR × 40).

GN : glomérule normale ; TDN : tubule distal normale ; NC : nécrose ; H : hémorragie ; BG :

Ballonisation des glomérules ; Espace de Bowman ↕

Conclusion

Nous avons cherché à travers notre étude de voir si une forte dose de valsartan (2600mg/Kg) provoque une génotoxicité et un stress oxydatif au niveau hépatique et rénal.

Nos résultats montrent que l'administration de valsartan et cyclophosphamide chez les souris, provoque :

- Une augmentation de la fréquence des érythrocytes micronucléés chez les souris, explorée par le test de micronoyaux.
- Une destruction des membranes cellulaires par les radicaux libres, aboutissant à une augmentation de la peroxydation lipidique
- Un déséquilibre du statut antioxydant enzymatique et non enzymatique cellulaire, marqué par la déplétion de l'activité de CAT, SOD et GSH.
- Altération de la structure architecturale du foie et rein.

A travers ces résultats, nous pouvons ni confirmer ni exclure les dommages chromosomiques provoqués par le valsartan, en raison du suivi limité, l'évaluation des effets à long terme n'était pas possible, et le faible nombre d'effectif rend difficile l'interprétation des résultats.

D'où la nécessité d'approfondir les recherches pour confirmer les résultats constatés dans notre étude et procéder au comptage des cellules conformément aux normes pour avoir des résultats plus fiables et sécurisés.

On suggère que : Chercher des méthodes analytiques pour séparer les impuretés de valsartan.

References
bibliographiques

A

Abe S, Sasaki M. Induction of sister-chromatid exchanges by indirect mutagens/carcinogens in cultured rat hepatoma and oesophageal tumor cells and in Chinese hamster Don cells co-cultivated with rat cells. *Mutat Res*, 1982; 93:409-418.

Abraham P, Rabi S. Nitrosative stress, protein tyrosine nitration, PARP activation and NAD depletion in the kidneys of rats after single dose of cyclophosphamide. *Clin. Exp. Nephro*, 2009; 13:281-287.

Araldi R P, Melo T C, Mendes T B, Carvalho R F, Souza E B, Stocco R C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015; 72: 74-82.

Arif K, Ejaj A, Maroof A, Azmat AK, Arun C, Fatima N, et al. Protective effect of liposomal formulation of tuftsin (a naturally occurring tetrapeptide) against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2009; 46(1): 45-52.

Ashok k. Hakya S. Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide Using Quality by Design, 2016; 32(2):777-788.

ATSDR et EPA. Agency for Toxic Substances, Disease Registry, and Environmental Protection Agency. Toxicological profil for N-nitrosodiméthylamine, 1989.

B

Bamborschke S, O'Connor PJ, Margison GP, Maru GB, Kleihues P. DNA methylation by dimethylnitrosamine in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): Implications for a non-inducible hepatic repair system for O⁶methylguanine. *Cancer Res*, 1983; 43:1306-1311.

Breda L, & Rivella S. Modulators of erythropoiesis: emerging therapies for hemoglobinopathies and disorders of red cell production. 2014, *Hematology/Oncology Clinics*, 28(2), 375-386

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation in biomembrane (part C: biological oxidation). *Methods in enzymologie*, Fleisher S. Fand Pcker L (EDS). London Academic Press, 1978; 52: 302309.<

Barcia, Juan J. The Giemsa stain: its history and applications. *Int. J Surg Pathol*, 2007; 15(3):292-6.

Barton TS, Wyrobek AJ, Hill FS, Robaire B, Hales BF. Numerical chromosomal abnormalities in rat epididymal spermatozoa following chronic cyclophosphamide exposure. *Biol Reprod*, 2003; 69(4): 1150-7.

Benhacine L et Sahil N. Etude de la génotoxicité des extraits de Pistacia lentiscus par le test d'Ames. *Génétique Appliquée*. Université A. MIRA – Bejaia, 2016 ; 46.

Bermudez E, Mirsalis JC, Eales HC. Detection of DNA damage in primary cultures of rat hepatocytes following in vivo and in vitro exposure to genotoxic agents. *Environ Mutagen*, 1982; 4:667-679.

Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976; 72: 248-254.

ᄀ

Chakraborty P, Hossain U SK, Murmu N, Kumar J D, Pal S, Bhattachary S. Modulation of cyclophosphamide-induced cellular toxicity by Diphenylmethylselenocyanate In vivo, an Enzymatic study. *Cancer Mol*, 2009; 6:183-189.

CIRC. Some N-nitroso Compounds: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon France, 1978.

Claiborne A. Catalase activity. In *CRC, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Ed. RA Greenwald). CRC Press Boca Raton FL, 1985: 283-284.

ᄁ

Dalaklioglu S, Genc G E, Aksoy N H, Akcit F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp. Toxicol*, 2013; 32: 662-671.

De Jonge M E, Huitema DR , Rodenhuis A, Beijnen SJ H. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin. pharmacol. kinet*, 2005; 44 (11): 1135-1164.

Dégremont C, Cachot J. La Génotoxicité, quel risque pour les espèces aquatiques. Fascicules Seine-Aval, 2009.

Deka S et Bhattacharjee A. Safety of a drug beyond molecule: what we have learned from recall of valsartan. *International Journal of current medical and Pharmaceutical Research*, 2018; 4(11):3884-3887.

Descat, F. *Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme*, 2002. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire Toulouse.

Dictionary Vidal. Version, 2012.

£

Eastmond D A, Hartwig A, Anderson D, Anwar W A, Cimino M C, Dobrev I, Douglas G R, Nohmi T, Phillips D H, Vickers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, 2009; 24(4):341-9.

EFSA. Scientific Committee. Draft Scientific Opinion on Genotoxicity Testing Strategies applicable in food and feed safety assessment. European Food Safety Authority. Available online, 2011.

Elespuru RK, Sankaranarayanan K. New approaches to assessing the effects of mutagenic agents on the integrity of the human genome. *Mutat Res*, 2007; 616(1-2):83-9.

Ellman GL. Plasma antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959; 82:70-77.

Erickson RP. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat Res*, 2010; 705(2):96-106.

Eslava et Ortega MI. Genotoxicity tests: Usefulness in occupational health Difficulties encountered in their application to the workers medical survey. *Arch. Public Health*, 2004; 62: 71-81.

F

Fardel O, Vernhet L, Jung A. V, Legrand-Lorans, A, & Nouvel V. Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets. 2009. In Journée de restitution RECORD.

Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 1999; 14(6):605-612.

Fenech M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol. Med.*, 2005; 111:3-32.

Flora De S, Izzotti A. Mutagenesis and cardiovascular diseases: Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2007; 621(1-2):5-17.

Fournier D, Hawari J, Sheryl H S, Kevin M C, Paul B. Biotransformation of N-Nitrosodimethylamine by *Pseudomonas mendocina* KR1. *Applied A Environmental Microbiology*, 2006: 6693–6698.

Fournier P. Biotransformation of dimethylnitrosamine. *Journal de Toxicologie Clinique et Expérimentale*, 1990; 10(5): 283-296.

Fournier R. ABC de l'apithérapie. Paris. Editions Grancher, 2009; 140.



Goff R, Walburger D K, Fairbairn J. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells Discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning*, 2006; 20: 407- 455.

Gollapudi B B, McFadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the micronucleus test. *Mutation Research*, 1995; 347(2): 97-99.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M. Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: Investigation in vitro and in vivo. *Nutrition*, 2011 ; 27 (7-8) : 838-884.

Graillot V. Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2012.

Gupta P K. Fundamentals of Toxicology Essential Concepts and Applications, Elsevier Science Publishing. Co In, USA, 2016.

Gutteridge J M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 1995; 41: 1819-1828.

Gutteridge J.M., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad.* 2000 ; 899: 136-147.

H

Haggerty HG, Holsapple MP. Role of metabolism in dimethylnitrosamine induced immunosuppression: a review. *Toxicology*, 1990; 63:1–23.

Hasin F, Noon S, Al Hasan H, Nasrin S. Comparative bioequivalence study of different brands of valsartan tablets marketed in Bangladesh by dissolution modeling AND quality control tests *World journal of pharmacy and pharmaceutical science*, 2017; 6 (7): 112-121.

Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 2009; 361(15):1475-85.

Houlot R. *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie.* Maloine, 1984; 19(21): 225-227.

I

Iengar V. Characterization of complex chromosomal rearrangement. *Mutation Research*, 2012; 92: 3-7.

Ikeuchi T, Sasaki M. Differential inducibility of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges by indirect mutagens in various mammalian cell lines. *Mutat Res*, 1981; 90:149-161.

Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Jujisawa M, Okada S. Dietary supplementation of curcumin enhanced antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocyt. *Pharmacol Toxicol*, 2003; 92: 33-38.

L

Jankowski M, Dyszkiewicz-Konwińska M, Magas M, Skorupski M, Gorecki G, Bukowska D & Zabel M. Haematopoiesis: living in the shadow of stem cell differentiation. *Journal of biological regulators and homeostatic agent.* 2018; 32(1), 1-6.

Jean J M and Hall K B. 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000; 98(1):37-41.

K

Kadam B R and Bari S B. Quantitative analysis of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high performance thin-layer chromatography with ultraviolet absorption densitometry. *Acta chromatographica*, 2007; 18.

Kerbusch. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamic of ifosfamide and its metabolites. *Clinical pharmacokinetics*. 2001; 40 (1): 41-62.

Kirkland D, Pfuhrer S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M and others. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res*, 2007; 628(1):31-55.

Kjeldsen S E, Brunner H R, Gordon T M, Stolt P. Valsartan in the treatment of hypertension, 2005.

L

Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, 2004; 52:314-322.

Lee VM, Keefer LK, Archer MC. An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and α -hydroxylation in the hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine. *Chem. Res. Toxicol*, 2006; 9:1319-1324.

Lemière S. Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale (Doctoral dissertation), Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 2004.

Lucy H, Swift L H, Golsteyn RM. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 2014; 15(3):3403-3431.

M

M Abdella E. Short-Term Comparative Study of the Cyclophosphamide Genotoxicity Administered Free and Liposome-Encapsulated in Mice. *Iran J. Cancer Prev.*, 2012; 2:51-60.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 1974; 47: 469-474.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 1974; 47: 469-474.

Mateuca R, Lombaert N, Aka P V, Decordier I, Volders KM. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 2006; 88(11): 1515-1531.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res*, 1990; 239:29-80.

Mehtap S, Sevgi T. BIOAVAILABILITY FILE: VALSARTAN. *FABAD J. Pharm. Sci*, 2007; 32:185-196.

Michel C. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissenapolyomorpha* : indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN, *Ecotoxicologie*, Université Pierre et Marie Curie, 2011.

Mirtuka B M, Rawnsley H M. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals-New-York: Masson pub. USA, 1977: 23-24, 41-57, 71-75.

MONOGRAPHIE DE PRODUIT. Pr^rDIOVAN-HCT^{MD} (comprimés de valsartan et d'hydrochlorothiazide) Novartis pharma. Canada inc. Numéro de contrôle de la présentation: 221691, Date de révision : 13 février 2019.

MONOGRAPHIE DE PRODUIT. Pr^rTEVA-VALSARTAN/HCTZ (comprimés de valsartan et d'hydrochlorothiazide) Teva Canada Limitée 30. Numéro de contrôle de la présentation : 188658, Date de révision : Le 06 novembre 2015.

Mostafalou S and Abdollah M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013; 268: 157–177.

Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004; 37(6): 793-802.

N

Nakashima H A, Kawashita N, Masuda C, Saxer M, Nina Y, Nagae & Kiwasaki. Identification of cytochrome P450 forms involved in the 4-hydroxylation of valsartan, a potent and specific angiotensin II receptor antagonist, in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 2005; 35(6): 589-602.

Naseem A C, Areeg A A, Shailesh K B, and Ziyaur R. Lesson Learnt from Recall of Valsartan and Other Angiotensin II Receptor Blocker Drugs Containing NDMA and NDEA Impurities. *AAPS Pharm. Sci. Tech*, 2019; 20:166.

Norata G D, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano A L. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*, 2007; 191 (2): 265-271.

O

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95(2): 351-358.

Olivie A, Pascale B, Marie A. DALMASSO : « pharmacie galénique B.P », 2ème édition, groupe Liaison SA, 2005.

Orsière, Thierry, et al. De la génotoxicologie à la biosurveillance, Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales, 2005 ; 28 : 25-28.

Orsolie N, Benkovic V, Lisicic D, Dikic D, Erhardt J, Knezevic H A. Protective Effects of Propolis and Related Polyphenolic/Flavonoid Compounds Against Toxicity Induced by Irinotecan. *MedOncol* in press, 2009.

Ostling O and Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 1984; 123: 291-298.

P

P Gosse. Dossier du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament CNHIM, Revue d'évaluation sur le médicament « Évaluation thérapeutique : SARTANS : antagonistes de l'angiotensine » Publication bimestrielle, 1999.

Parr M K et Joseph J F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2019; 5(164):536-549.

Paulo M S L, Souza I F, Wandekoken K G. Micronucleus test in peripheral blood of rats treated with hyperbaric oxygen after subtotal splenectomy preserving the lower pole. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2015; 30 (4):1678-2674.

Pette M, Gold R, Pette D F, Hartung H P, Toyka K V. Mafosfamide induces DNA fragmentation and apoptosis in human T-lymphocytes. A possible mechanism of its immunosuppressive action. *Immunopharmacology*, 1995; 30: 59-69.

Poštulka J, Slavicek P, Fedor J, Farnik M, Kocisek J. Energy Transfer in Microhydrated Uracil, 5-Fluorouracil, and 5-Bromouracil. *The Journal of Physical Chemistry*, 2017; 121(38): 8965-8974.



Reeba A, Ravish F, Veena M, Riaz A. Effect of N'-nitrosodimethylamine on red blood cell rheology and proteomic profiles of brain in male albino rats. *A. Interdisciplinary Toxicology*, 2011; 4(3): 125–131.

Rehman M U, Tahir M, Ali F et al. Cyclophosphamide –induced nephrotoxicity and damage in kidney genomic DNA of swiss albino mice the protection effect of Ellagic acid. *Molecule and cellular biochemistry*, 2012; 365:199-127.

Ricou-Berthelot A. RISQUE GENOTOXIQUE ET OVOCYTES. Etude sur modèle souris de la génotoxicité des cryoprotecteurs et des protocoles de vitrification ovocytaire. Thèse de doctorat. Université d'Aix-Marseille, 2014.

Rieger R, Michaelis A, Green M M. A glossary of genetics and cytogenetics, classical and molecular. 3rd ed. New York, Springer, 1968.

Rogers A M, Back K C. Comparative mutagenicity of 4 DNA-intercalating agents in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1982; 102(4):447-455.



Santillán M E, Bujaidar E M, González I Á, Martínez S M T, Salinas G J, Bautista M, González M Á, Rubio G M, Faisal A J L, Morales-González J A. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastro enterol*, 2014; 20 (40): 14787–14804.

Santos A C, Uyemura S A, Lopes J L C, Bazon J N, Mingatto F E, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Red Biol Med*, 1998; 24:1455-1461.

Saydam M, takka S. Bioavailaity file: valsartan. *Fabad. J. Pharm. Sci*, 2007; 32:185-196.

Schmid W. The micronucleus test. *MutatRes*, 1975; 31: 9-15.

Shirkhedkar AA, Suraj R C, Amod S P, Sanjay J. A Concise Review on Analytical Profile of Valsartan .*Eurasian journal of Analytical Chemistry*, 2017; 12(4):337-364.

SiddiquiN, Asif H, ChaudhryL, Shamsheer M A, Mitra M ,Parminder S. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011; 01 (04): 12-19.

Slatter MA, Gennery AR. Primary immuno-deficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert Rev Mol Med*, 2010; 12:9.

Sobreira N L, GnanakkanV, Walsh M, Marosy B, Wohler E, Thomas G, Valle D. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generationsequencing. *Genomeresearch*, 2011; 21(10):1720-1727.

Stankiewicz A,Skrzydlewska E. Protection Against cyclophosphamide-induced Renal oxidative stress by Amifostine: The Role of Antioxidative Mechanisms. *Toxico. Mech. Meth*, 2003; 13:301-308.

Sun J, Ramos A, Chapman B, Johnnidis J. B, Le. L, Ho Y. J, & Camargo F. D. Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*. 2014; 514(7522), 322.

Sung JH, Kim KK, Kim DW, Kim JO, Lee BJ, Yong C S, Choi HG. Novel valsartan-loaded solid dispersion with enhanced bioavailability and no crystalline changes, *Int J Pharm*, 2012; 422:202-210.

Suzuki N, Mukai H. Y, & Yamamoto M. In vivo regulation of erythropoiesis by chemically inducible dimerization of the erythropoietin receptor intracellular domain. *PloS one*. 2015; 10(3), e0119442

J

Tag H M. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015; 15:252.

Taglietti F, M Drapeau C, Grilli E, Capone A, Noto P, Topino S, et Petrosillo N. Hemolytic anemia due to acute cytomegalovirus infection in an immunocompetent adult. a case report and review of the literature. *Journal of medical case reports*3. 2010; vol 4: no 1, p 334.

Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 2003; 18: 187-194.

Thuillez C, Amah G. Mécanismes d'action de l'association amlodipine-valsartan. 2007 ; 21:4.

Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, Kram D J, Kirkland D, MacGregor JT, Marzin D and others. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007; 627(1):41-58.

Tripathi D N, Jen G B. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 2009; 180:398–406.

V

Viala A, Botta A. Toxicologie. 2ème édition. Ed : Lavoisier, 2009 :03-10,20-21.

Vincent F. Rapport relatif au projet d'étude en génotoxicité de l'environnement marin, 1993.

Z

Zaid AN, Cortesi R, Qaddomi A, Khammash S. Formulation et bioéquivalence de deux comprimés de valsartan après une administration orale unique. *Sci Pharm*, 2011; 79 (1): 123-135.

Annexes

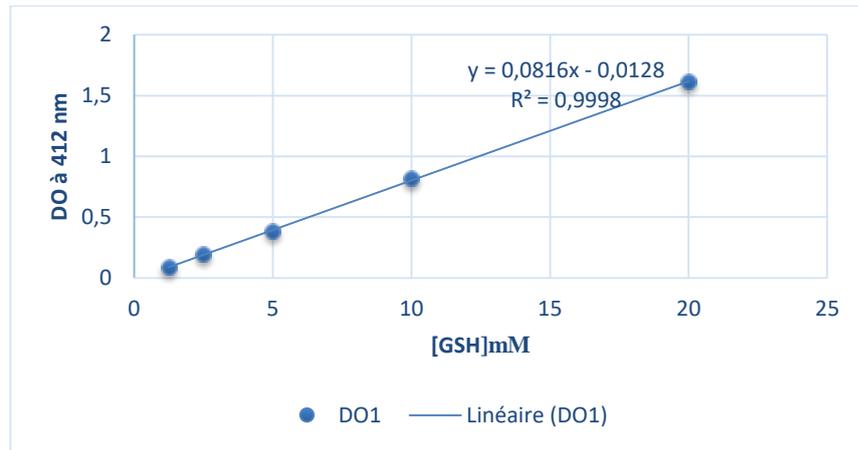


Figure 1 : Courbe d'étalonnage du GSH.

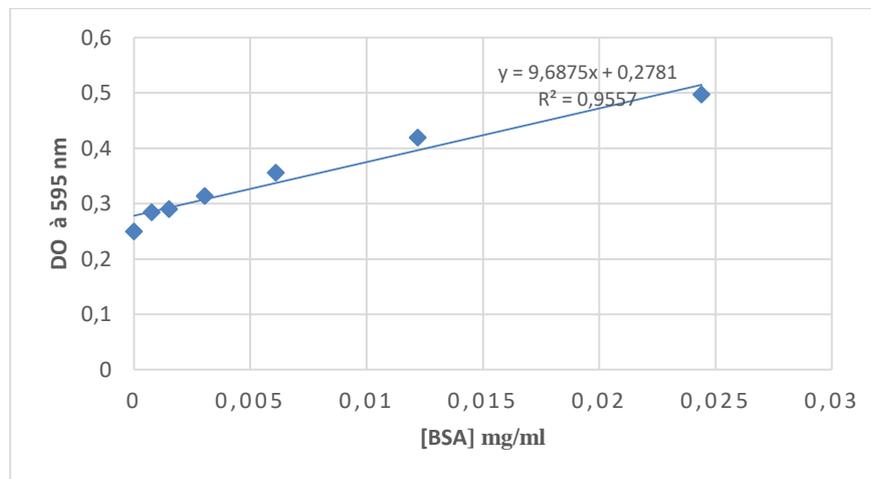


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des protéines (BSA).

Présenté par : Bellout Chafiaa Bourouissa Nabila	Encadré par : Dr. Bouhafis Leila Date de soutenance : 24/07/2019
Thème : Evaluation de la génotoxicité et du stress oxydatif induits par le valsartan : un antagoniste de l'angiotensine II	
Master Académique en Biologie : Option Science pharmacologique	

Résumé : Le valsartan est un antagoniste de récepteur AT1 de l'angiotensine II, il est préconisé pour traiter l'hypertension. La NDMA est une impureté trouvée lors de la fabrication de la matière première du valsartan, cette dernière est fortement génotoxique. La présente étude vise donc, d'une part ; à évaluer la génotoxicité de ce médicament suite au traitement par une forte dose de valsartan (2600mg/Kg/2jours) en comparaison avec un contrôle négatif et la cyclophosphamide comme contrôle positif, et d'autre part à comparer l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité du valsartan. En effet en comparaison avec le témoin négatif, le test de micronoyaux révèle que chez les souris traitées par le valsartan et la cyclophosphamide, les érythrocytes micronucléés sont augmentés, le niveau de peroxydation lipidique (MDA) est élevé, les paramètres antioxydants (catalse (CAT), superoxydedismutase (SOD), et glutathion (GSH)) sont réduits. Nos résultats suggèrent probablement que le valsartan induit une génotoxicité et un stress oxydatif hépatique et rénale.

Mots clés : valsartan ,cyclophosphamide, génotoxicété , stress oxydative , NDMA.

Summary: Valsartan is an angiotensin II AT1 receptor antagonist, it is recommended for the treatment of hypertension. NDMA is an impurity found during the manufacture of the raw material of valsartan, the latter is highly genotoxic. The present study therefore aims, on the one hand; to evaluate the genotoxicity of this drug following treatment with a high dose of valsartan (2600mg / kg / day) compared to negative control and cyclophosphamide as positive control, and secondly to compare the hepatotoxicity and nephrotoxicity of valsartan . In comparison with the negative control, the micronucleus test reveals that in the mice treated with valsartan and cyclophosphamide, the micronucleated erythrocytes are increased, the level of lipid peroxidation (MDA) is high, the antioxidant parameters (catalase (CAT), superoxydedismutase (SOD), and glutathione (GSH)) are reduced. . Our results probably suggest that valsartan induces genotoxicity and hepatic and renal oxidative stress.

Key words: Valsartan, cyclophosphamide, genotoxicity, oxydative stress, NDMA.

المخلص:

فالسارتان مضاد لمستقبلات AT1 لـ الانجيوتنسين II يوصى به لعلاج ارتفاع ضغط الدم. وتعتبر NDMA من الشوائب التي تم العثور عليها أثناء تصنيع المادة الأولية للفالسارتان، والتي تعتبر مادة سامة للغاية. تهدف هذه الدراسة الى تقييم تأثير هذه المادة على السمية الكبدية والكلوية والسمية الوراثية بعد العلاج بجرعات عالية من الفالسارتان (2600 مغ / كغ / لمدة يومين) بالمقارنة مع شواهد سلبية والسيكلوفوسفاميد كشاهد ايجابي. وبالفعل لوحظ لدى الفئران المعالجة بالفالسارتان و المعالجة بالسيكلوفوسفاميد تفاعل في كريات الدم الحمراء ذات النواة الصغيرة، ومستوى سائل البيروكسيد MDA بالإضافة إلى انخفاض في معايير مضادات الأوكسدة الكاتالاز CAT و سيبارأوكسيد ديسموتاز SOD و الجلوتاثيون GSH .
تقترح نتائجننا أنه من المحتمل أن يحدث الفالسارتان سمية وراثية وإجهاد تأكسدي على مستوى الكبد والكلية .

الكلمات المفتاحية: فالسارتان، سيكلوفوسفاميد، السمية الوراثية، إجهاد التأكسدي, NDMA

