

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
1892
رقم الجرد :

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la
Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة و علوم الطبيعة و الحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme

Master 2 en Biologie

Option : Pharmacologie expérimentale



Intitulé

Activité antioxydante de l'extrait brut de la plante *Thapsia garganica* d'Algérie contre le stress rénal et cardiaque induit par la doxorubicine

Membres de jury :

Président : Mr. KHENNOUF Tarek

Examineur: M^{me}. KEBSA Wided

Encadreur : Dr. ALYANE Mohammed

Présenté par :

BOUKRICHE Fatima Zohra

FENEK Hanane

BOUREDJOUL Souhila

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

Nous exprimons notre profonde gratitude au Dr. ALIYANE Mohammed (Université de Jijel), qui nous fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils pertinents nous ont permis de mener à terme ce travail.

Nous remercions les membres de jury (Mr. KHENNOUF Tarek, Mme. KEBSA Wided) d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Mme. BENGHEDOUAR Lamia, pour son aide précieux et chaleureux.

Nous remercions assez les ingénieurs de laboratoire de Pharmacologie (université de Jijel) surtout M^{me} ZINE Houria, Ratiba, Asma et Madjda, ainsi qu'à Dr. ZARAT Abdelouahab le médecin du laboratoire centrale (Hôpital du Taher) et Mr. BENTOUBAL Ferhat, pour les nombreux services qu'ils nous ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de nos remerciements les plus amicaux.

Un grand merci à nos familles, à nos parents qui nous ont soutenus durant tous ses années d'études et qui nous ont encouragés sans cesse.

En guise de reconnaissance, nous dédions ce travail

à nos chers parents, à nos familles

ainsi qu'à tous nos amis.

SOMMAIRE

Sommaire	i
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
INTRODUCTION GENERALE	1

CHAPITRE 1 : LA PLANTE *Thapsia garganica* ET LES POLYPHENOLS

Partie 1: Description de la plante étudiée <i>Thapsia garganica</i>	3
1. donnés botaniques	3
1.1. Les Apiacées	3
1.2. Position systématique	3
1.3. Présentation et description de la plante <i>Thapsia garganica</i>	4
2. Distribution géographique et habitat	4
3. Ethnopharmacologie de <i>Thapsia garganica</i>	5
3.1. Usages médicaux	5
3.2. Utilisations pharmacologiques	6
4. Données phytochimiques et biologiques	6
4.1. Les huiles essentielles	6
4.2. Les sesquiterpènes lactones « la thapsigargine »	7
4.3. Les polyphénols	7
Partie 2: Polyphénols & Flavonoïdes	8
1. Introduction	8
2. Définitions	8
2.1. Polyphénols	8
2.2. Flavonoïdes	9
3. Structure et classification	9
3.1. Flavonoïdes	9
3.1.1. Classification	9
3.2. Les non flavonoïdes	10
3.2.1. Les phénols simples	10
3.2.2. Les acides phénoliques	10
4. Pharmacocinétique des flavonoïdes	11
5. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes	12
5.1. Activité antioxydant	12
5.1.1. Piégeage direct de radicaux libres	12
5.1.2. Chélation des ions métalliques	13
5.1.3. Inhibition enzymatique	14

5.2. Autres activités des flavonoïdes	14
---	----

CHAPITRE 2 : STRESS OXYDANT

1. Les radicaux libres	15
2. Les espèces réactives de l'oxygène	15
3. Balance antioxydante et stress oxydant	15
4. Sources biologiques de radicaux libres	16
4.1.Sources endogènes	16
4.1.1. La mitochondrie	16
4.1.2. Cytochrome P-450	16
4.1.3. NADPH oxydase (NADPHO)	16
4.1.4. La xanthine oxydase (XO)	17
4.1.5. La NO synthase	17
4.1.6. Le peroxyosome	17
4.2.Sources exogènes	17
5. Dommages biologiques du stress oxydant	17
5.1. Les lipides	18
5.2. ADN	19
5.3.Protéines	19
6. Systèmes de défenses antioxydants	20
6.1. Systèmes enzymatiques	20
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	20
6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR)	20
6.1.3. Catalase (CAT)	21
6.2. Systèmes non enzymatiques	21

CHAPITRE 3 : ANTHRACYCLINES

1. Historique	22
2. Structure	22
3. Mécanisme d'action de la doxorubicine	23
4. Pharmacocinétique	24
5. Métabolisme de la doxorubicine	25
6. Mécanismes de toxicité de la DOX	25
6.1. Formation des ROS lors du métabolisme de la DOX	26
6.1.1. Voie enzymatique	26
6.1.2. Voie non enzymatique	27
6.2. Altérations liée au stress oxydant engendré par la DOX	28
6.2.1 Toxicité rénales	28
6.2.2 Toxicité cardiaque	28

CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES

Partie 1 : Etude chimique de la plante	29
1. Matériel végétal	29
2. Extraction	29

2.1.Racines	29
2.2.Partie aérienne	30
3. Séparation liquide-liquide	30
4. Dosage des polyphénols totaux	31
4.1.Principe	31
4.2.Déroulement du dosage	31
5. Dosage des flavonoïdes	32
5.1.Recherche qualitative des flavonoïdes	32
5.2.Dosage des flavonoïdes totaux	32
6. Etude du pouvoir anti-radicalaire des différents extraits	32
6.1.Méthode qualitative	33
6.2.Méthode quantitative	33
Partie 2 : Etude <i>in vivo</i>	34
1. Animaux et conditions d'hébergement	34
2. Traitement	34
3. Prélèvement du sang, sacrifice des animaux et prélèvement des organes (reins et cœur)	35
4. Dosages biochimiques	35
4.1.Urée créatinine	35
4.2.Activités enzymatiques	35
5. Dosage tissulaires	35
5.1.Dosage du malondialdéhyde (MDA) ou test TBARS	35
5.2.Dosage du glutathion	36
6. Dosage des enzymes antioxydantes dans le cytosol	37
6.1.Préparation de la fraction cytosolique	37
6.2.Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) cytosolique	37
6.3.Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique	38
6.4.Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) cytosolique	38
7. Dosage des protéines	39
8. Etude statistique	40

CHAPITRE 5 : RESULTATS ET INTERPRETATION

Partie 1 : Etude chimique de la plante	41
1. Extraction	41
2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	42
3. Identification des flavonoïdes par la réaction de Shibata	44
4. Etude de l'activité antiradicalaire par le test au DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	44
4.1.Méthode qualitative (CCM)	44
4.2.Méthode quantitative	45
Partie 2 : Etude <i>in vivo</i>	46
1. Effet de la doxorubicine sur l'évolution du poids corporel	46
2. Effet de la doxorubicine sur quelques paramètres biochimiques	46
2.1.Atteinte rénale	47

2.1.1. Urée sanguine	47
2.1.2. Créatinine sérique	47
2.2. Atteinte cardiaque	48
2.2.1. Activité de la créatine kinase (CK)	48
2.2.2. Activité de la transaminase glutamique oxaloacétique (TGO)	49
2.2.3. Activité de la transaminase glutamique pyruvate (TGP)	49
3. Effet de l'extrait sur les indicateurs tissulaires du stress oxydant	50
3.1. Peroxydation lipidique	50
3.2. Variations du taux de glutathion (GSH)	51
3.3. Variation de l'activité des enzymes antioxydants	53

CHAPITRE 6: DISCUSSION

Discussion	57
------------------	----

CONCLUSION	63
-------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	65
---	----

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Planche botanique de <i>Thapsia garganica</i>	3
Figure 2. Répartition mondiale de <i>Thapsia garganica</i>	5
Figure 3. Structure du thapsigargine.....	7
Figure 4. Squelette de base des flavonoïdes.....	9
Figure 5. Structures de base des principaux flavonoïdes.....	10
Figure 6. Schéma de la pharmacocinétique des flavonoïdes chez les animaux supérieurs.....	12
Figure 7. Piégeage des ROS (R•) par les flavonoïdes.....	13
Figure 8. Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me ⁿ⁺)	13
Figure 9. Mécanisme de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (acide arachidonique) et nature des produits terminaux formés.....	19
Figure 10. Structure chimique de la doxorubicine.....	23
Figure 11. Le métabolisme de la DOX.....	25
Figure 12. Voie enzymatique de la formation des ROS par la DOX.....	26
Figure 13. Voie non enzymatique de la formation des ROS par la DOX.....	27
Figure 14. Profil chromatographique du screening de l'activité anti-radicalaire des extraits de racines et de la partie aérienne de la plante <i>Thapsia garganica</i>	44
Figure 15: Effet du prétraitement par l'extrait de <i>Thapsia garganica</i> , et du traitement par la doxorubicine sur le poids corporel des rats.....	46
Figure 16: Effet de la doxorubicine et de l'extrait végétal sur les taux sériques de l'urée.....	47
Figure 17: Variation des taux de la créatinine sérique après traitement par la doxorubicine et l'extrait végétal de <i>Thapsia garganica</i>	48
Figure 18: Evolution de l'activité de la créatine kinase après administration de la doxorubicine et le prétraitement par l'extrait du <i>Thapsia garganica</i>	48
Figure 19: Variation de l'activité enzymatique de la TGO après traitement par la doxorubicine seule ou associée avec l'extrait du <i>Thapsia garganica</i>	49
Figure 20: Variation de l'activité enzymatique de la TGP après traitement par la doxorubicine seule ou associée avec l'extrait du <i>Thapsia garganica</i>	50

Figure 21a: Variation du taux de MDA dans le cœur	51
Figure 21b: Variation du taux de MDA dans les reins	51
Figure 22a : Variation du taux de GSH dans le cœur	52
Figure 22b : Variation du taux de GSH dans les reins	52
Figure 23a: Variation de l'activité enzymatique de la GST dans le cœur	54
Figure 23b: Variation de l'activité enzymatique de la GST dans les reins.....	54
Figure 24a : Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le cœur.....	55
Figure 24b : Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans les reins.....	55
Figure 25a: Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le cœur	56
Figure 25b: Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans les reins	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	15
Tableau 2. Rendements des diverses fractions extraites à partir des racines et de partie aérienne de la plante <i>Thapsia garganica</i>	41
Tableau 3. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits de racines et de la partie aérienne de la plante <i>Thapsia garganica</i>	43
Tableau 4. Activité antiradicalaire des extraits de la plante <i>Thapsia garganica</i>	45

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOH	Acide acétique
BSA	Albumine sérique bovine
CAT	Catalase
CK	Créatine kinase
DOX	Doxorubicine
DPPH	2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl
DTNB	5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50
IP	Intrapéritonéal
MDA	Malondialdéhyde
NBT	Nitro blue Tetrazolium
n-BuOH	n-butanol
PA	Partie aérienne
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Acide trichloroacétique
TG	Thapsigargine
TGO	Transaminase glutamique oxaloacétique
TGP	Transaminase glutamique pyruvate

Introduction ✓

Générale

Introduction générale

La sagesse populaire qui recommande de se méfier de ses meilleurs amis s'applique parfaitement à l'oxygène, molécule dont on ne pourrait se passer au-delà de quelques minutes et qui est pourtant à l'origine de production de radicaux libres. Ces derniers sont produits par divers mécanismes physiologiques et en permanence car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable, mais certaines agressions comme l'irradiation, les rayonnements UV ou les substances toxiques peuvent entraîner une production excessive de radicaux oxygénés toxiques. La surproduction des radicaux libre au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au « stress oxydant » qui est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs – peut-être de la plupart – des voies pathologiques (Favier, 2003). Dans le cas des médicaments anticancéreux (exemple des anthracyclines) en plus des propriétés antitumorales, ils présentent des effets secondaires notamment une néphrotoxicité et une cardiotoxicité dose-dépendante (Hou et al., 2009), généralement attribuées à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène responsables de complications cliniques associé à une mortalité importante.

Pour vivre (et survive), l'organisme doit donc être capable de se protéger des effets nocives induits par les radicaux libres, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé. Parmi ces antioxydants, les flavonoïdes qui sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols produites au cours du métabolisme secondaire des plantes.

Les plantes médicinales sont actuellement à l'étude pour leurs propriétés pharmacologiques dans la régulation du stress oxydatif. *Thapsia garganica* L. est une plante médicinale poussant spontanément en Algérie. Parfois, elle est considérée comme toxique et en médecine traditionnelle l'usage de cette plante est réservé aux traitements externes comme révulsif et antirhumatismal (Baba Aissa, 2000).

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants:

- Analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des différentes phases obtenues à partir d'un extrait brut alcoolique de *Thapsia garganica*.
- Evaluation de l'activité anti-radicalaire des différents extraits du *Thapsia garganica* vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH°) *in vitro*.
- Induction d'un stress oxydant par l'administration d'une dose aiguë d'un anticancéreux (Doxorubicine 15mg/kg) par voie intrapéritonéale. L'étude est réalisée *in vivo* chez des de souche *Wistar albinos*.
- Evaluation de l'effet préventif de l'extrait du *Thapsia garganica*, administré pendant 6 jours à la dose de 10 mg/kg/jour par voie intrapéritonéale, contre un stress oxydatif rénal et cardiaque.

Chapitre 1

La plante

Thapsia garganica

&

Polyphénols

La plante *Thapsia garganica* et les polyphénols

PARTIE 1: DESCRIPTION DE LA PLANTE ETUDIEE *Thapsia garganica*

1. Données botaniques

1.1. Les Apiacées

La plante *Thapsia garganica* appartient à la famille des **Apiacées** (*Apiaceae*), appelées anciennement **Ombellifères** (*Umbelliferae*), est une famille de plantes dicotylédones. Selon Watson et Dallwitz, elle comprend près de 3000 espèces réparties en 420 genres et sont surtout présentes dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle.

Les Apiacées sont généralement des plantes herbacées annuelles, parfois bisannuelles ou vivaces. La famille compte aussi des arbres et arbustes, comme le buhlèvre.

1.2. Position systématique

Selon les classifications classiques, les Apiacées sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des Apiales.



- ✓ Règne ⇒ *Plantae*
- ✓ Division ⇒ *Magnoliophyta*
- ✓ Classe ⇒ *Magnoliopsida*
- ✓ Ordre ⇒ *Apiales*
- ✓ Famille ⇒ *Apiaceae* (anciennement, *Ombelliferae*)
- ✓ Genre ⇒ *Thapsia*
- ✓ Espèce ⇒ *Thapsia garganica*

Noms vernaculaires

Nom en Arabe ⇒ Bounafaâ بونافع

Nom en Kabyle ⇒ Aderyis (la dérias) دريس

(Baba Aissa, 2000)

Figure 1: Planche botanique de *Thapsia garganica* (Linné, 1767)

1.3. Présentation et description de la plante *Thapsia garganica*

Le mot *Thapsia* dérive du nom de l'île de *Thapsus*, voisine de la côte de Sicile (au sud de l'Italie), parce que c'est dans cette île qu'elle a été d'abord découverte. *Garganica* vient de *Garganus*, mont d'Apulie (actuellement les Pouilles) (**Linné, 1767 ; Gaffiot, 1934**).

Cette plante herbacée vivace présente une tige striée, glabre, vert-grisâtre, ramifiée dans sa partie supérieure, atteignant de 0,90 à 1,40m de hauteur. Les feuilles sont vertes, glabres. Les feuilles primordiales sont petites, elliptiques et entières, les suivantes sont palmatilobées. Les feuilles de la base de la tige sont grandes, 2-3 pennatiséquées, les supérieures sont réduites à une gaine large (Fig. 1) (**Pottier-Alapetite, 1981**). La racine est divergente, horizontale, rameuse, 1 m de longueur et de 3 à 4 cm de diamètre (**Cauvet, 1869**), noirâtre extérieurement, blanche intérieurement (**Cazin, 1868**), remplie d'un suc laiteux, très caustique (**Roques, 1835**).

Les inflorescences jaunâtres, en grandes ombelles presque sphériques, à 15-20 rayons, sans involucre; calice à 5 lobes courts et corolle à 5 pétales lancéolés, courbés à leur sommet; 5 étamines; un ovaire inférieur terminé par deux styles (**Baba Aissa, 2000**).

Le fruit est elliptique, comprimé dorsalement, de 10-15 sur 20-25 mm, à échancrures plus ou moins larges au sommet et à la base. Ailes latérales très développées, brillantes, d'un jaune paille, finement striées (**Pottier-Alapetite, 1981**).

2. Distribution géographique et habitat

Thapsia garganica est présente en Algérie (Fig. 2), en Maroc, en Tunisie et en Lybie mais aussi en Turquie, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Grèce (**Hand, 2011**).

En Algérie, elle est très réponde sur les hauts plateaux de Constantine, Sétif, Media, Tlemcen (**Daumas, 1848**). Elle affectionne les localités marécageuses, ou plutôt les environs des marécages, les marais en voie de dessiccation et le bord des ruisseaux (**Soubeiran, 1870**), aussi, les lieux rocheux, les champs et les pentes ensoleillées. Elle croit en abondance, spontanément et sans aucune culture dans les conditions suivantes :

- ✓ **Exposition:** Plein soleil;
- ✓ **Humidité:** Sol sec à moyen;
- ✓ **Sol:** Sol léger à moyen, riche en humus;
- ✓ **pH:** Sol acide ou calcaire.

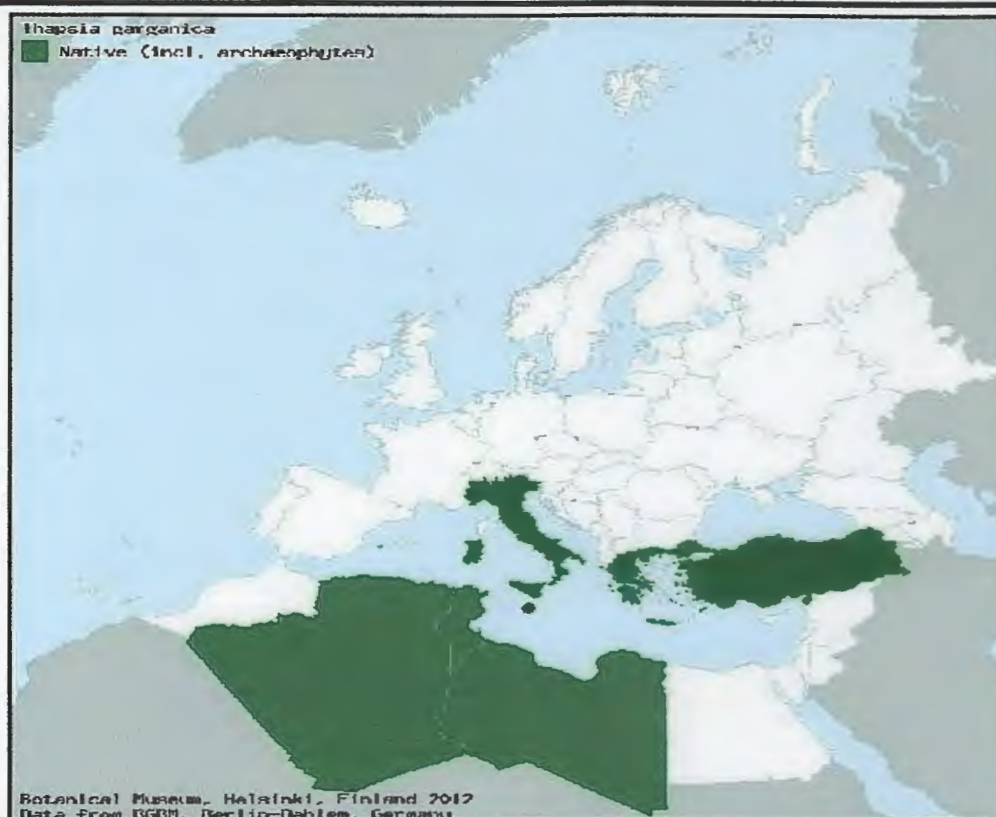


Figure 2 : Répartition mondiale de *Thapsia garganica* (Hand, 2011)

3. Ethnopharmacologie de *Thapsia garganica*

3.1. Usages médicaux:

En médecine populaire algérienne, l'usage de cette plante toxique est réservé aux traitements externes, généralement sous forme de décoction aqueuse ou de macération huileuse de racine, en applications locales contre les douleurs rhumatismales, ou quelquefois sur le thorax pour traiter les bronchites et la toux (Doreau, 1961; Jäger et al, 1993; Baba Aissa, 2000). Déjà en 1850, Prax signalait que cette espèce contient un poison mais que sa racine est utilisée pour combattre les douleurs (Le Floc'h, 1983).

La résine vésicante abondante surtout dans l'écorce de la racine, est un révulsif très actif (Paris et Dilleman, 1960). La plante est réputée immuniser préventivement, un an durant, contre la rage. Aussi elle sert en cataplasmes contre les fluxions et les abcès (Bouquet, 1921; Gattefossé, 1921).

Pour combattre les effets d'une morsure de serpent ou d'une piqûre de scorpion, on utilise un emplâtre de feuilles de *Thapsia garganica* (réduites en poudre) (Louis, 1979).

Cauvet rapporte que *Thapsia garganica* est toxique pour les chameaux « car elle contient dans sa partie aérienne un suc rouge et corrosif qui brûle l'estomac de l'animal et le tue ». Cette toxicité est également signalée par Paris et Dilleman (1960); Paris et Moyses (1967) et Rodin et al. (1970) (**Le Floch, 1983**).

Les signes toxicologiques de cette plante peuvent varier entre des vomissements; diarrhées violentes; inflammation de la muqueuse digestive; une sécrétion salivaire; des désordres nerveux; une colique violente; gastroentérite et peuvent aller jusqu'à la mort (**Bnouham et al., 2006**).

3.2. Utilisations pharmacologiques

La seule préparation pharmaceutique à base de la plante *Thapsia garganica* est l'emplâtre de Thapsia. Que l'on obtient en incorporant de la résine de Thapsia à un mélange de cire blanche colophane, poix blanche, térébenthine etc... (**Soubeiran, 1870**).

Cet emplâtre est utilisé par application sur la peau, cette dernière s'irrite, s'échauffe, rougit, devient le siège d'une démangeaison insupportable, puis apparaît une éruption de vésicules miliaires nombreuses, très-rapprochées, remplies d'une sérosité purulente (**Rebouleau, 1856**). Il n'y a pas de douleur et il est convenable d'enlever cet emplâtre après 4 à 6 heures (**Ellingwood, 1919**).

4. Données phytochimiques et biologiques

La plante *Thapsia garganica* contient des composés secondaires utiles tels que les huiles essentielles, des coumarines et des sesquiterpènes (**Makunga et al., 2003**).

4.1. Les huiles essentielles

L'étude de **Gherraf et ses collaborateurs (2011)** fait l'analyse par CPG/MS de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de la plante *Thapsia garganica* qui a montré que l'huile essentielle se compose principalement de monoterpènes. Le constituant dominant est le p-vinylguaïacol, qui compose 59-63% de l'huile, suivie de linalool et de 1,4-diméthylazulène avec 6-8% et 6-7% respectivement. D'autres composés: limonène, géraniol, p-cymène, myrcène, sabinène, β -pinène...etc. sont aussi présents à des petites quantités.

L'huile essentielle extraite des racines contient principalement de l'élémicine (54 à 73 %) et de la latifolone (20–32%) (**Avato et Rosato, 2002**).

4.2. Les sesquiterpènes lactones « la thapsigargine »

Les sesquiterpènes: δ -cadinene, α - et δ -guaïene, elemol et guaïols sont les principaux composés volatiles des racines du *Thapsia garganica* (Drew et al., 2012), dont la thapsigargine (TG) (figure 3) qui est isolés à partir des fruits et des racines de cette plante (Makunga et al., 2005; Liu et al., 2006) et qui est capable d'induire la libération d'histamine de diverses cellules. Cette propriété est à l'origine des propriétés vésicantes, mais aussi de l'intoxication humaine si elle est consommée en interne (Ali et al., 1985). Ce composé, actif aux concentrations de nM (Denmeade et al., 2003), joue le rôle d'un inhibiteur sélectif de la pompe Ca^{2+} /ATPase du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (SERCA) spécifique chez les cellules animales (Picard, 2005), aussi il pourrait offrir un nouveau type de chimiothérapie pour le traitement du cancer de la prostate (Jäger et al, 1993). Le TG possède une activité virustatique en inhibant la production des maladies infectieuses cytomégalovirus (CMV), la réplication des virions de l'hépatite C (VHC), le virus herpès simplex (HSV). Aussi il est un inducteur modeste de la production d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et il est capable d'induire la sécrétion d'interféron γ -(IFN- γ) dans les macrophages de rats et les souris, et aussi dans les cellules humaines mononuclées du sang périphérique (Kmoníčková et al., 2008).

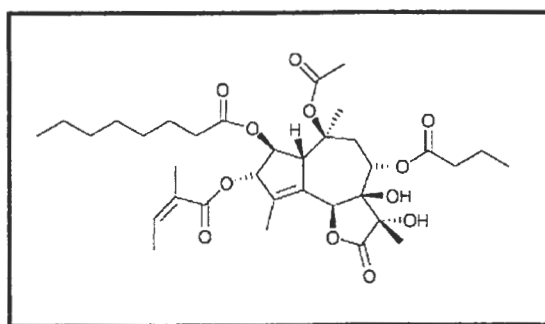


Figure 3: Structure du thapsigargine (Newman et al., 2005)

4.3. Les polyphénols

Plusieurs travaux ont montrés que la plante *Thapsia garganica*, écorce de la racine et les feuilles (Rached et al., 2010), contiennent des polyphénols dont la classe dominante est celle des flavonoïdes et des dérivés hydroxycinamiques (Djeridane et al., 2007). L'importance de ces polyphénols réside dans leurs propriétés chimiques, à savoir :

- ✓ Ces composés possèdent des capacités antioxydants, ils peuvent jouer un rôle important en adsorbant et en neutralisant les radicaux libres, tel que l'anion superoxide, les radicaux d'hydroxyle, et le peroxyde d'hydrogène (Djeridane et al., 2006).

- ✓ Les flavonoïdes de la partie aérienne sont capables d'inhiber l'activité d'un certain nombre des enzymes digestives comprenant la carboxylestérase (CE) (Stocker et al., 2004), et l' α - amylase de mammifère, par l'inhibition de cette dernière la plante participe à l'abaissement de l'hyperglycémie (Khacheba, 2008).

PARTIE 2: POLYPHENOLS & FLAVONOÏDES

1. Introduction

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes.

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Wainapel et Fast, 2003). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Chen et al., 2004), des maladies inflammatoires (Laughton, 1997), cardiovasculaires (Frankel et al., 1993) et neurodégénératives (Orgogozo et al., 1997). Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Les polyphénols sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de shikimate et la voie de l'acétate, celle de l'acide shikimique conduisant après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate) (Chira et al., 2008). Certains polyphénols sont issus d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate entraînant ainsi la formation de composés mixtes. Cette voie intermédiaire est notamment à l'origine de tous les flavonoïdes (Mansour, 2009).

2. Définitions

2.1. Polyphénols

Le terme polyphénol a été introduit en 1980 en remplacement du terme ancien de tanin végétal, et a été défini par comme suit: «Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines». Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé (Chira et al., 2008).

2.1. Flavonoïdes

Le terme «flavonoïdes» désigne un groupe de plus de 6000 composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des plantes vasculaires où ils sont responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Di Carlo et al., 1999; Havsteen, 2002; Ghedira, 2005).

3. Structure et classification

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Chira et al., 2008).

3.1. Flavonoïdes

Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Fig. 4) (Havsteen, 2002 ; Ghedira, 2005).

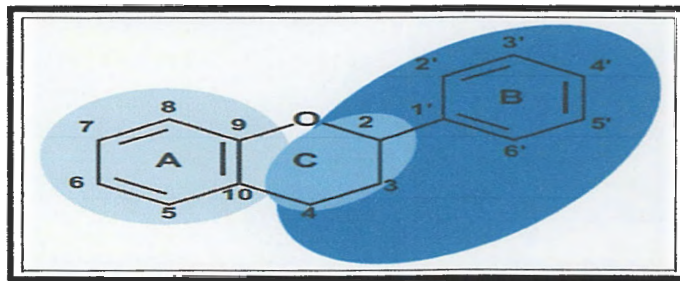


Figure 4: Squelette de base des flavonoïdes (Chira et al., 2008). En bleu ciel, pont 3 carbone ; en bleu médian, partie provenant de la voie de l'acide shikimique ; en bleu foncé, partie provenant de la voie de l'acétate.

Ils comprennent 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques (Chira et al., 2008).

3.1.1. Classification

Tous les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone.

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le

terme isoflavonoïdes (Di Carlo et al., 1999 ; Ghedira, 2005).

Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue :

- ✓ les flavones et les flavonols,
- ✓ les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols (Fig. 5).

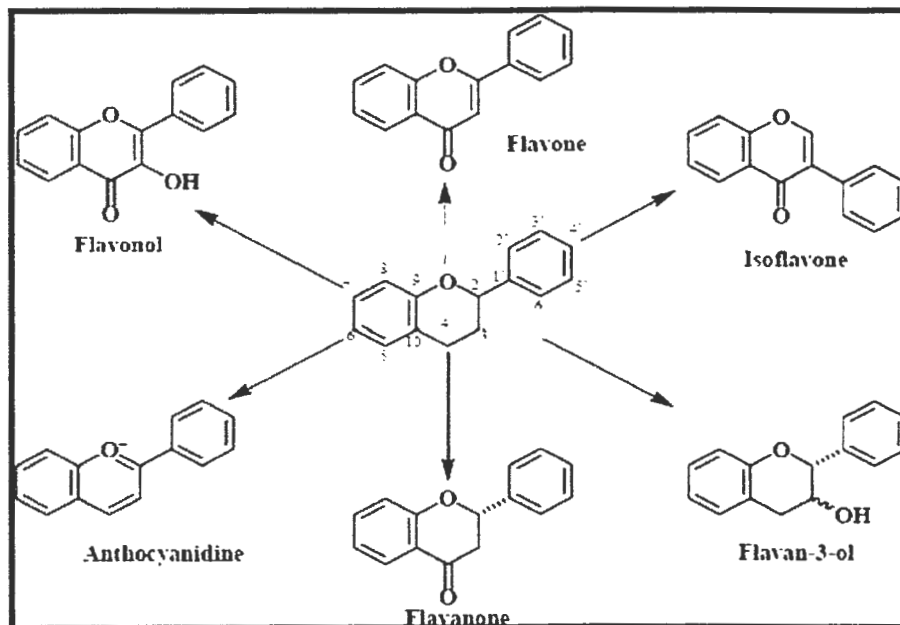


Figure 5 : Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira et al., 2008).

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (Di Carlo et al., 1999 ; Havsteen, 2002).

3.2. Les non flavonoïdes

Les principaux non-flavonoïdes d'importance alimentaire sont les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques et les stilbènes (Chira et al., 2008).

3.2.1. Les phénols simples

Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique.

3.2.2. Les acides phénoliques (Chira et al., 2008)

- ❖ Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone.

- ❖ *Les acides hydroxycinnamiques* : l'acide cinnamique est un composé C6-C3 produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonia-lyase. L'acide cinnamique et les acides hydroxycinnamiques sont aussi désignés sous le terme de phénylpropanoïdes. Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbones, avec un ou plusieurs groupements hydroxyles souvent estérifiés en ester d'alcoolaliphatique.
- ❖ *Les stilbènes* : les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène. Ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales, ce qui a été démontré pour le transresvératrol.

4. Pharmacocinétique des flavonoïdes

Les études montrent que la biodisponibilité des flavonoïdes dépend de la capacité de transport à travers la bordure en brosse des entérocytes; de l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et de la capacité de la sécrétion biliaire. Ils présentent une faible biodisponibilité avec une élimination lente qui diffère d'un flavonoïde à l'autre (**Rémésy et al., 2003**).

Les flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement la membrane de l'intestin grêle (**Williamson et al., 2000 ; Ghedira, 2005; Mansour, 2009**), tandis que les flavonoïdes glycosylés, qui sont des molécules assez grandes et fortement polaires, ne pourraient pas être absorbées après l'ingestion orale. Une étude a alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes glycosylés facilite leur passage dans les entérocytes via le système de transport des glucides (**Hollman et Katan, 1997**). Ensuite ces flavonoïdes glycosylés ont été hydrolysés sous l'action des glycosidases de la flore intestinale au niveau du côlon (**Blaut et al., 2003**) et les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent également être dégradées par la microflore en acide phénolique, lui-même absorbé ou éliminé via les fèces (**Walle, 2004**).

Une fois absorbés, les flavonoïdes sont transformés, dans l'entérocyte, en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation, et les conjugués issus atteignent alors le foie via la veine porte, où ils sont encore métabolisés par les enzymes de conjugaison (**Middleton et al., 2000 ; Scalbert et al., 2002 ; Walle, 2004**).

Les flavonoïdes ne sont ni accumulés ni stockés par le foie. Dans les hépatocytes, ils sont transportés vers l'appareil de Golgi (Fig. 6) et probablement aussi vers les peroxysomes où ils subissent une dégradation oxydative. Leurs produits de décomposition (acide caféique et acide cinnamique ainsi que leurs dérivés) sont complètement excrétés avec l'urine à un taux semblable à celui de la caféine (Havsteen, 2002).

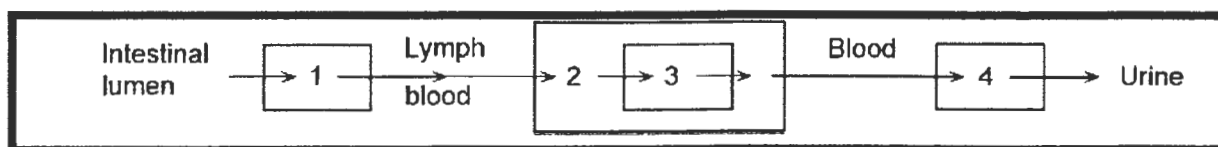


Figure 6: Schéma de la pharmacocinétique des flavonoïdes chez les animaux supérieurs. Passage des flavonoïdes (1) à travers les cellules épithéliales intestinales; puis dans la lymphe (2) et le sang, dans l'hépatocyte; l'appareil de Golgi (3) ou peroxysome; de nouveau dans le sang et enfin excrétion par les cellules du tubule rénal (4) (Havsteen, 2002).

La bile est le principal site d'élimination des métabolites, et l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale. Une fraction de ces flavonoïdes conjugués est déversée dans le sang et atteint leur tissu cible pour avoir un effet biologique potentiel ou bien être éliminée dans les urines. Cependant, les autres fractions pourraient être déversées dans l'intestin via la bile et les métabolites peuvent être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale libérant ainsi de nouveaux aglycones en constituant probablement un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang (Hollman et Katan, 1997 ; Scalbert et al., 2002).

5. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes

5.1. Activité antioxydant

Les résultats obtenus de nombreuses études ont montré que l'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend essentiellement de leur structure. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres (Shih et al., 2005), en captant les cations métalliques ou en inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS (Meziti, 2009 ; Madi, 2010).

5.1.1. Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation significative d'électron, de ce fait stabilisant leurs formes radicalaires (Guohua Cao et al., 1997; Cos, 1998). À cause de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R') (Meziti, 2009 ; Madi, 2010).



Le radical flavonoxy résultant ($Fl-O^{\bullet}$) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (fig.7).

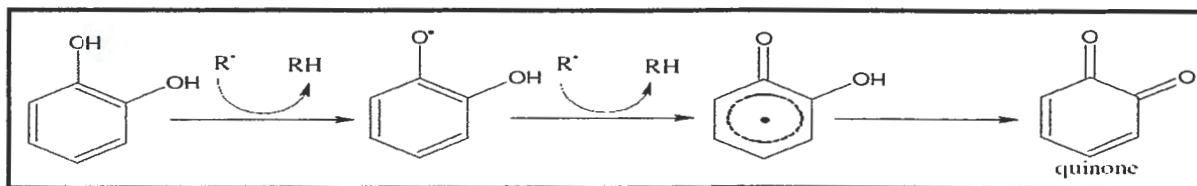


Figure 7: Piégeage des ROS (R^{\bullet}) par les flavonoïdes (Meziti, 2009)

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (Meziti, 2009). La capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend donc, non seulement du potentiel redox du couple $Flav-O^{\bullet}/Flav-OH$, mais aussi de la réactivité du radical aroxyde (Rice-Evans, 1996).

5.1.2. Chélation des ions métalliques

Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles très réactifs via la réaction de Fenton (Zeghad, 2009). Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production des ROS, pour cette raison sont considérés comme de bons chélateurs (Dušan Malešev et al., 2007).

On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (fig. 8): Un noyau catéchol sur le cycle B, Les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C. Les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Chebil, 2006).

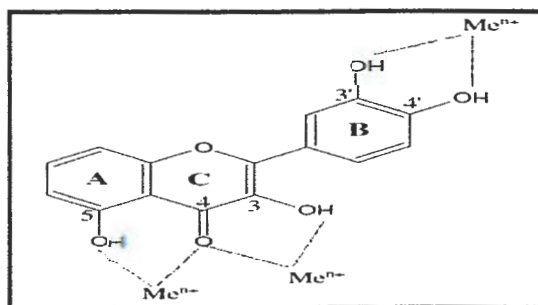


Figure 8: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (Chebil, 2006)

5.1.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de nombreuses enzymes appartenant à différentes voies métaboliques. Dans certains cas, l'inhibition est compétitive mais le plus souvent elle est de type allostérique. L'inhibition inclue l'aldose réductase, la phospholipase A2, la cyclooxygénase, lipo-oxygénase, les hydrolases, les oxydoréductases, l'ADN synthétases, l'ARN polymérase, phosphatases, les protéines phosphokinases, les oxygénases, les acide aminé oxydases et la DNA topoisomerase II.

Malgré la disparité d'enzymes que les flavonoïdes inactivent, ils n'entraînent pas des perturbations de tout métabolisme mais affectent juste quelques voies. Ce faible effet, de la part de composés chimiquement très réactifs, s'expliquerait en partie par leur faible hydrosolubilité qui permet de les garder en faible concentration, ainsi qu'à leur courte demi-vie (**Havsteen, 2002**).

5.2. Autres activités des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent une activité anti-inflammatoire, ils augmentent la perméabilité capillaire et exercent un effet inhibiteur sur l'exsudation de protéine et la migration de leucocyte (**Pelzer et al., 1998**). Ils sont capable de modifier le métabolisme d'acide arachidonique dans les plaquettes et inhiber la formation des médiateurs de l'inflammation tel que la prostaglandine et les leucotriènes (**Chi et al., 2001 ; Delporte et al., 2005**).

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition de l'AMPC phosphodiesterase et la Ca^{++} -ATPase; les enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (**Mansour, 2009**).

Parmi les effets protecteurs des flavonoïdes contre les maladies cardiovasculaires, leurs capacités à empêcher l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), aussi des études ont montré que la consommation de thé vert ou noir peut réduire le risque de la coagulation sanguin, de l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, et diminue le taux du cholestérol dans le mur aortique in vivo (**Yao et al., 2004**).

Grâce à leurs capacités à empêcher les systèmes de la prolifération cellulaire, l'effort oxydant, et leurs capacités à induire les enzymes de désintoxication, l'apoptose, les flavonoïdes sont considérés comme agents antinéoplasiques et des protecteurs contre le cancer (**Hollman et Katan, 1999**).

Chapitre 2

STRESS

OXYDANT

Stress oxydant

1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (Favier, 2003).

2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou ROS en anglais, pour Reactive Oxygen Species regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (tableau 1) (Boutabet, 2007).

Tableau 1: Les principales espèces réactives de l'oxygène (Boutabet, 2007)

Nom	Formule
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\circ-}$
Radical hydroxyle	OH°
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical peroxyde	ROO°
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO°
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO°
Peroxyde nitrite	ONOO^-
Hypochlorite	ClO^-

3. Balance antioxydante et stress oxydant

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance antioxydants/proxydants est en équilibre (Droge, 2002). Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un

déséquilibre entre production de radicaux libres et système de défense est à l'origine d'un état rédox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Favier, 2003).

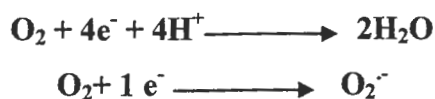
4. Sources biologiques de radicaux libres

4.1. Source endogène

4.1.1. La mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire considéré comme une des principales sources de ROS dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Servais, 2004)

Dans cet organite, l'oxygène est l'accepteur final d'électron après une cascade de réaction d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP. Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau : il est dévié pour former des espèces dérivées de l'oxygène très réactives (O_2°) (Favier, 2003).



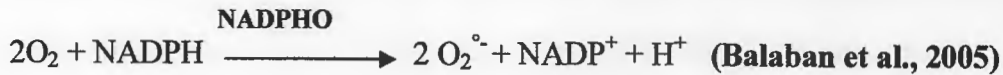
Il existe deux sites de production de ROS: les complexes I (NADH-Ubiquinone oxydoréductase) et le complexe III (Ubiquinol - cytochrome c oxydoréductase ou complexe b-c1) (Balaban et al, 2005).

4.1.2. Cytochrome P-450 : (microsome)

Enzyme du réticulum endoplasmique lisse, catalyse une série de réactions des substrats endogènes (cholestérol, les stéroïdes, l'acide arachidonique) et des substrats exogènes au cours de la détoxification des xénobiotiques, produisant ainsi les ROS (O_2° et H_2O_2), il semble que cette production radicalaire régule les fonctions du réticulum comme par exemple la sécrétion de protéines (Servais, 2004).

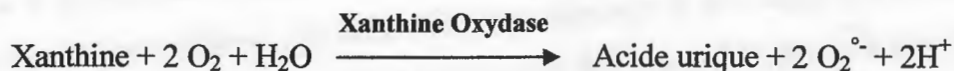
4.1.3. NADPH oxydase (NADPHO)

C'est une oxydase liée à la membrane plasmique. Elle a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire dans la lutte contre les microorganismes. Il semble qu'il existe aussi une NADPH dans les cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Piotrowski et al, 2000), elle catalyse la formation d' O_2° :



4.1.4. La xanthine oxydase (XO)

Est une enzyme soluble présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique (Da Silva et al., 2004; Pacher et al., 2006). Cette enzyme elle transforme l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, produisant au cours de chacune de ces deux réactions un anion superoxyde (Chaaya, 2010).



4.1.5. La NO synthase

Enzymes responsables de la synthèse de monoxyde d'azote (NO°) à partir de l'un des atomes d'azote terminaux du groupement guanidine de la L-arginine dans les tissus mammifères (Vergely et Rochette, 2003 ; Chaaya, 2010).



4.1.6. Le peroxyosome

Est un organite intracellulaire bordé d'une membrane effectuant des réactions de peroxydation lipidique. Dans le peroxyosome, il y a une production intense de H_2O_2 suite à la présence de nombreuses enzymes qui génèrent le peroxyde d'hydrogène pour être utilisé substrat par la catalase peroxydomiale afin de réaliser des réactions de peroxydation avec d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein (Servais, 2004).

4.2. Sources exogènes

Les ROS peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, (rayons ionisants X, gamma, ou des rayons ultraviolets) capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisants. Les ROS peuvent aussi générés par des métaux lourds, le tabac et les médicaments... (Pincemail et al., 1999).

5. Dommages biologiques du stress oxydant

Dans les conditions physiologiques normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité. Ces ROS jouent de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la

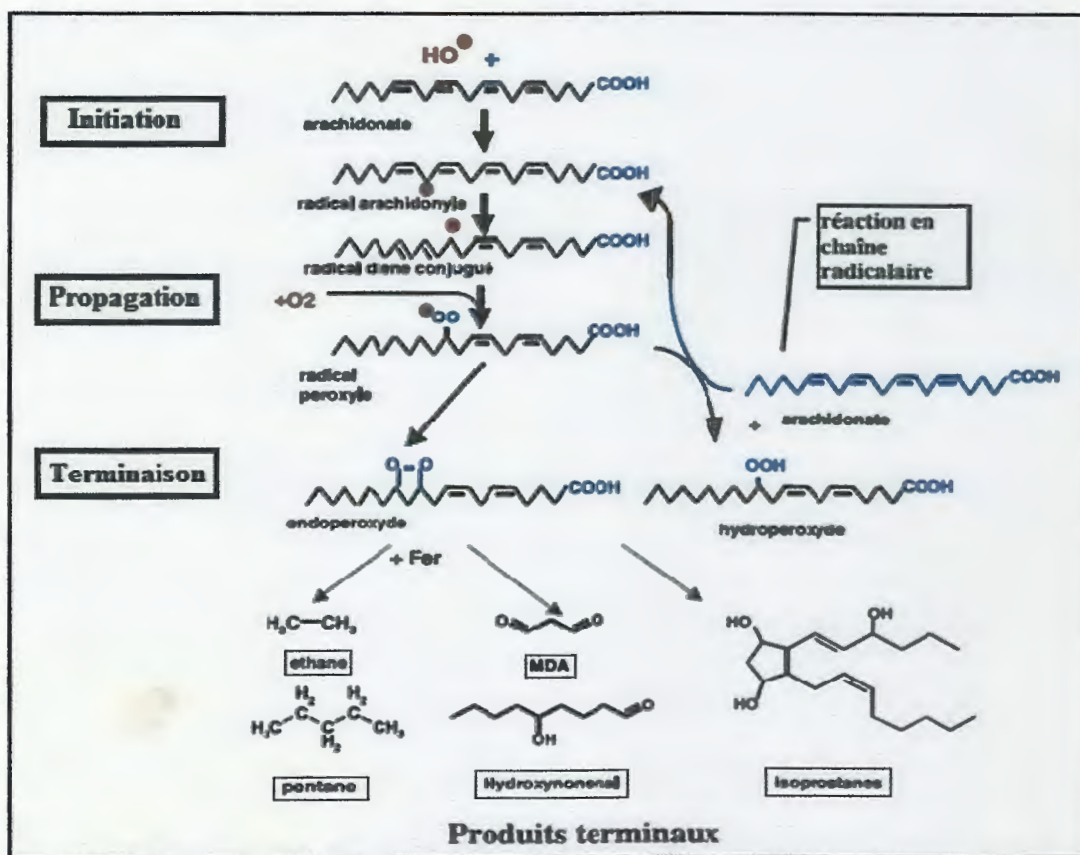


Figure 9: Mécanisme de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (acide arachidonique) et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

5. 2. ADN

ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Le radical hydroxyle peut générer une perte de bases « sites abasiques », des cassures simple- ou double-brins, des altérations des sucres (2-désoxyriboses) et aussi des pontages ADN-protéines, des modifications des bases puriques et pyrimidiques (Cadet et al., 2003; Favier, 2003). Par exemple, l'oxydation de la guanine, base constitutive de l'ADN, et leur transformation en 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH₂DG) (Cadet et al., 2002), qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer (Pincemail et al., 1999).

5. 3. Protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ROS sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (Pincemail et al., 1999).

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent une fonction thiol (SH). Ces protéines modifiées par oxydation perdent leurs

propriétés biologiques (enzyme, transporteurs, récepteurs...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Favier, 2003).

6. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006).

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Gardès et al., 2003).

6.1. Systèmes enzymatiques

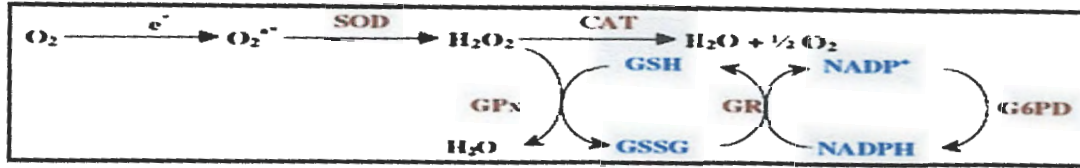
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) ou EC 1.15.1.1.

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, en catalysant leur dismutation en oxygène et peroxyde d'hydrogène ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$). Elle assure, ainsi, la première ligne de défense contre le stress oxydant (Milane, 2004).

Il existe deux types de superoxyde dismutases, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu,Zn-SOD) et qui est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse (Mn-SOD) et est présente dans les mitochondries (Gardès et al., 2003).

6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La GR, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995; Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant:



6.1.3. Catalase (CAT) ou EC 1.11.1.6.

La catalase est une enzyme répartie dans les tissus (Milane, 2004 ; Borg et Reeber, 2008). Elle catalyse la décomposition de H₂O₂ selon la réaction suivante :



La CAT est localisée principalement dans le peroxyosome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme (Milane, 2004).

6.2. Systèmes non enzymatiques

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003).

La bilirubine est capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe²⁺/Fe³⁺ ou Cu²⁺/Cu⁺ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemail et al., 2002; Koechlin-Ramonatxo, 2006). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Pincemail et al., 2002). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, huiles essentielles (Bruneton, 1999). Flavonoïdes apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Chapitre 3

Anthracyclines

Anthracyclines: Doxorubicine

1. Historique

Les premières anthracyclines ont été découvertes et isolées au début des années 60 presque simultanément en Italie, par **Di Marco** et ses collaborateurs des laboratoires Carlo **Erba**, et en France par Dubost et son équipe du laboratoire **Rhône-Poulenc** à partir de pigments produits par des bactéries du genre *Streptomyces* (*Streptomyces peuceticus* et *Streptomyces coeruleorubidus*) (**Minotti et al., 2004 ; Robert, 2005; Takemura et al., 2007**).

La première anthracycline fut appelée Rubidomycine par l'équipe française et Daunomycine par l'équipe italienne, mais l'étude de la structure de ces deux molécules montra qu'elles sont identiques. Pour tenir compte de cette double origine, le produit fut baptisé Daunorubicine, alors que la doxorubicine (DOX) fut isolée quelques années plus tard en Italie et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 (**Hande, 1998**): on la considère comme le chef de file de ces médicaments (**Weil, 1988**). Le suffixe « rubicine » rappelle leur couleur rouge intense (**Pein et al., 1995**).

La daunorubicine et la DOX ont suscité de nombreux travaux de microbiologie et de chimie visant à obtenir de nouvelles anthracyclines d'efficacité antitumorale et/ou d'indice thérapeutique améliorés ainsi qu'une meilleure tolérance cardiaque (**Lavelle, 1988**). Ainsi, plus d'une centaine d'anthracyclines d'origine naturelle et plus d'un millier, voire 2000 analogues, ont été obtenus par hémisynthèse (modifications chimiques, substitution et/ou conjugaison au niveau du noyau tétracyclique de la chaîne latérale ou sur la daunosamine) et par synthèse totale sont actuellement connus (**Lavelle, 1988 ; Minotti et al., 2004**), mais peu d'entre eux sont entrés en pratique clinique tel que l'epirubicine et l'idarubicine, considérée comme les alternatives de la DOX et de la daunorubicine respectivement (**Hande, 1998; Minotti et al., 2004**).

2. Structure

Les anthracyclines possèdent la structure polyaromatique des tétracyclines, avec un aminosucre, la daunosamine, qui est attachée par une liaison glycosidique (Fig. 10). Les agents cytotoxiques de cette classe ont tous une structure quinone et hydroquinone, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons (**Hortobágyi, 1997; Chabner et al., 2006**).

après utilisation de fortes concentrations de médicament, autrement dit utilisation de doses supracliniques. Cependant l'utilisation *in vitro* de doses cliniques (faibles) d'anthracyclines montre que le mécanisme anti-topoisomérase II et secondairement, l'effet intercalant, sont de loin les mécanismes responsables des effets cytotoxiques observés *in vivo* (Minotti et al., 2004; Takemura et al., 2007).

4. Pharmacocinétique

Les propriétés pharmacocinétiques de la doxorubicine ont été déterminées chez l'homme après injection bolus, perfusion courte (15 min à 1 h) et perfusion continue (4 jours) (Marcot et al., 1997).

La cinétique plasmatique après une administration par bolus présente une diminution initiale rapide, suivie d'une autre diminution lente de la concentration plasmatique (Wilkinson et al., 1974). Les concentrations initiales sont 50 fois supérieures à celles observées au début de la phase terminale (Green et al., 1983).

Cette diminution du niveau plasmatique a été attribuée à la capacité rapide d'accumulation intracellulaire du médicament dans les tissus suivie d'une libération lente à partir des tissus ainsi qu'à son élimination (Wilkinson et al., 1974). Ces constatations ont été confirmées aussi bien chez l'animal que chez l'homme. En effet, il a été montré qu'après une administration intraveineuse chez les rongeurs, la DOX est rapidement éliminée du plasma et se concentre dans le foie, la rate, les reins, les poumons et le cœur. Alors que chez l'être humain son élimination plasmatique est également rapide.

Le volume de distribution de la DOX a été estimé à 25 L/kg, suggérant un degré significatif de captation par les tissus (Spetch et al., 1988). Ce grand volume de distribution, lorsqu'il est combiné avec le taux relativement rapide de la clairance de la circulation, donne comme résultat une faible concentration du médicament dans la tumeur et une toxicité importante pour les tissus normaux (Drummond et al., 1999).

La DOX et ses métabolites sont majoritairement excrétés par voie biliaire, 41 % de la dose injectée l'est principalement sous forme inchangée, sur une période de 7 jours. L'élimination urinaire est faible et représente, en moyenne, 5 % de la dose administrée. la DOX se caractérise par une demi-vie d'élimination terminale d'environ 30 h (Marcot et al., 1997).

5. Métabolisme de la doxorubicine

Le métabolisme de la DOX est essentiellement hépatique, il nécessite la présence d'oxygène et des enzymes tels que le cytochrome p-450 réductase, NADPH déshydrogénase et NO-synthase (fig. 11) (Kim, 2006). Il s'effectue au deux niveaux :

- ✓ La réduction d'un groupe carbonyle en C-13 dans la chaîne latérale de la DOX par une aldo-cetoréductase (NAPDH-dépendant oxydoréductase) formant le doxorubicinol (DOXol) qui est alcool secondaire (Minotti et al., 1998), c'est le métabolite majeur de la drogue trouvé dans le plasma, la bile et l'urine (Vrignaud et al., 1986). Le doxorubicinol peut ensuite être métabolisé en doxorubicinol aglycone ou préférentiellement en deoxydoxorubicinol aglycone. Enfin la deoxydoxorubicinol aglycone peut être convertie en métabolites plus polaires d'o-sulfate ou d'o-glucoronide (Takanashi et al., 1976).
- ✓ Déglycosylation : celle-ci constitue une voie mineure de métabolisation. Elle est sous dépendance de glycosidases microsomiales présentes dans le réticulum endoplasmique. Elle conduit à la formation des métabolites inactifs le deoxyaglycones qui sont doxorubicin aglycone et le deoxydoxorubicin aglycone (Mross et al., 1990).

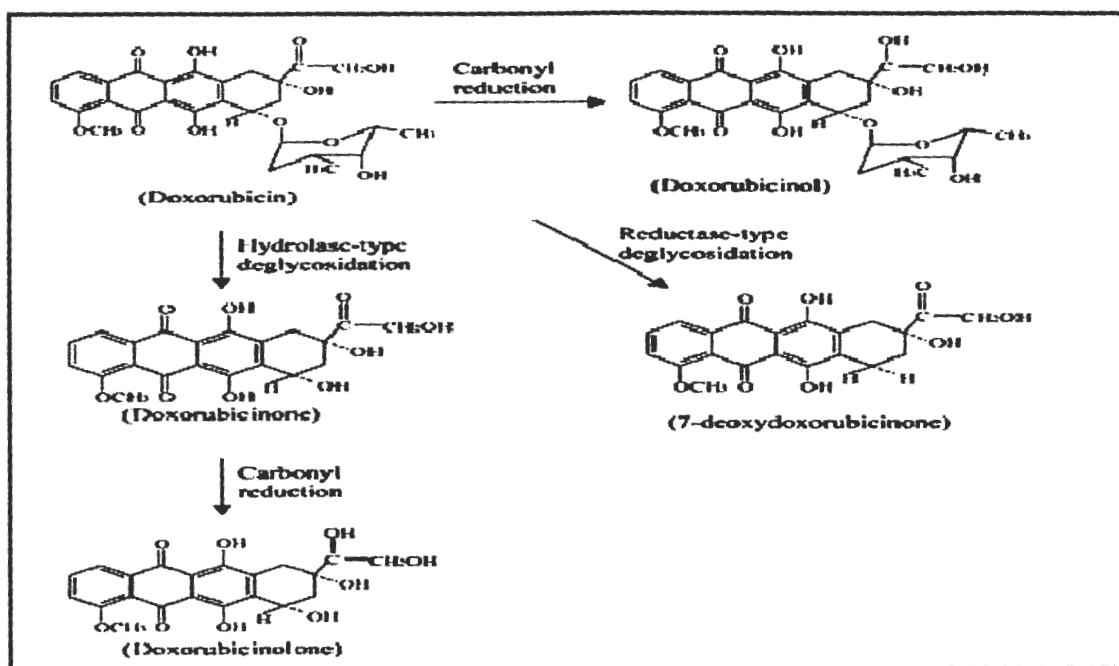


Figure 11: Le métabolisme de la DOX (Zhou et al., 2002)

6. Mécanismes de toxicité de la DOX

L'utilisation clinique de la DOX est limitée par sa toxicité rénale et cardiaque (Malisza et Hasinoff, 1996 ; Hou et al., 2009). Le mécanisme exact de la toxicité induite par la DOX demeure peu clair. Des travaux ont proposé que cette toxicité soit le plus susceptible négocié par la formation des radicaux libres oxygénés (ROS), qui causent un stress oxydant au niveau des

composants cellulaires, et des lipides membranaires de la membrane plasmique et des mitochondries (Hou et al., 2009; Lahouel et al., 2010).

6.1. Formation des ROS lors du métabolisme de la DOX

Lors du métabolisme de la DOX, deux voies différentes de formation de radicaux libres ont été décrites (Horenstein et al., 2000; Liu et al., 2007):

6.1.1. Voie enzymatique

La DOX et les autres anthracyclines sont capables d'induire une production accrue de radicaux libres oxygénés du fait de leur structure de type quinone, pouvant subir une réduction par addition d'un électron à la moitié quinone dans l'anneau C pour aboutir à la formation d'un dérivé semi-quinone radicalaire. Ce dérivé peut lui-même subir une réduction en hydroquinone, ou retourner à la forme quinone en cédant son électron célibataire à l'oxygène moléculaire, produisant ainsi des radicaux superoxydes ($O_2^{\circ-}$) (Delemasure et al., 2006 ; Liu et al., 2007). Le radical superoxyde peut lancer la peroxydation lipidique ou être converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (Horenstein et al., 2000). Ce cycle est catalysée par un certain nombre NAD(P)H oxydoréductases (cytochrome P450 ou b5 réductase, NADH mitochondrial déshydrogénase, la xanthine déshydrogénase) (fig. 12) (Minotti et al., 2004). Au cours de ce cycle, le semiquinone peut être transformé en 7-deoxyaglycone. En raison de leur solubilité dans les lipide, cet aglycone s'intercale dans les membrane biologiques et forme des ROS à proximité des cibles sensible (Licata et al., 2002).

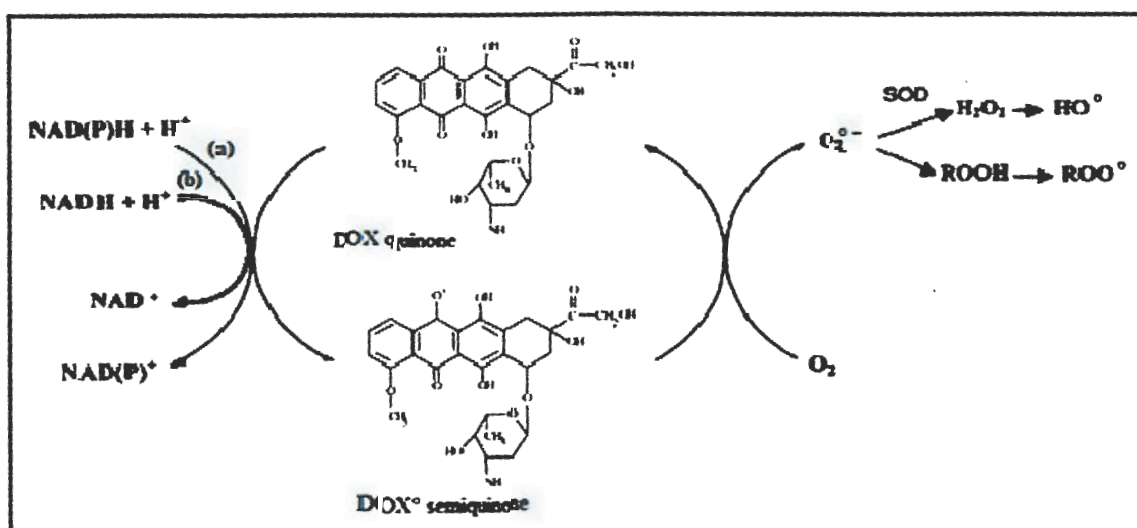
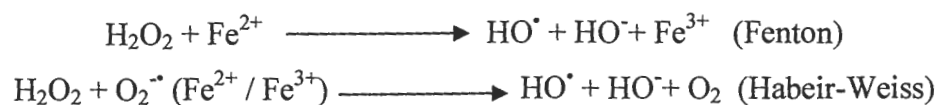


Figure 12: Voie enzymatique de la formation des ROS par la DOX. La DOX sous la forme quinone accepte un électron du $NAD(P)H + H^+$ ou $NADH + H^+$ dans réactions catalysées par NADPH cytochrome P-450 réductase (a) or NADH déshydrogénase (b). Ceci rapporte un radical libre semi-quinone (DOX°) (Horenstein et al., 2000; Minotti et al., 2004).

6.1.2. Voie non enzymatique

Dans cette voie, les radicaux libres de DOX sont produits par un mécanisme qui implique des réactions avec les métaux de transition, et en particulier le fer (Fe^{3+}) (Myers, 1998). Théoriquement, la DOX, comme beaucoup de dérivés d'anthracyclines, a trois sites possibles de liaison pour les métaux: un site représenté par l'atome d'azote de la daunosamine, et les deux autres sites sont l'oxygène du noyau quinone et l'oxygène du groupe phénol (Jung et Reszka, 2001).

Au sein de la cellule, l'ion ferrique Fe^{3+} libre, libéré de ses sites de stockage transferrine et ferritine par l'attaque des anthracyclines, se lie à trois molécules d'anthracyclines pour former un complexe très stable: Fe^{3+} -(anthracycline)₃. Ce complexe peut subir un cycle interne d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe radicalaire Fe^{2+} -(anthracycline)₃. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation de radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$. Le radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ est incorporé dans le peroxyde d'hydrogène dans une réaction catalysée par la SOD. L'accumulation de radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 , à l'origine d'une production accrue de radicaux hydroxyles (HO^{\cdot}) par la voie de Fenton et de Haber-Weiss, d'autant que le complexe Fe^{3+} -(anthracycline)₃ se comporte comme un puissant catalyseur de la réaction (Delemasure et al., 2006).



Aussi le radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut agir avec les lipides des membranes cellulaires et forme des peroxydes lipidiques (radical alkoxy et radical peroxy) qui endommagent les membranes cellulaires et mitochondriales (fig.13) (Horenstein et al., 2000).

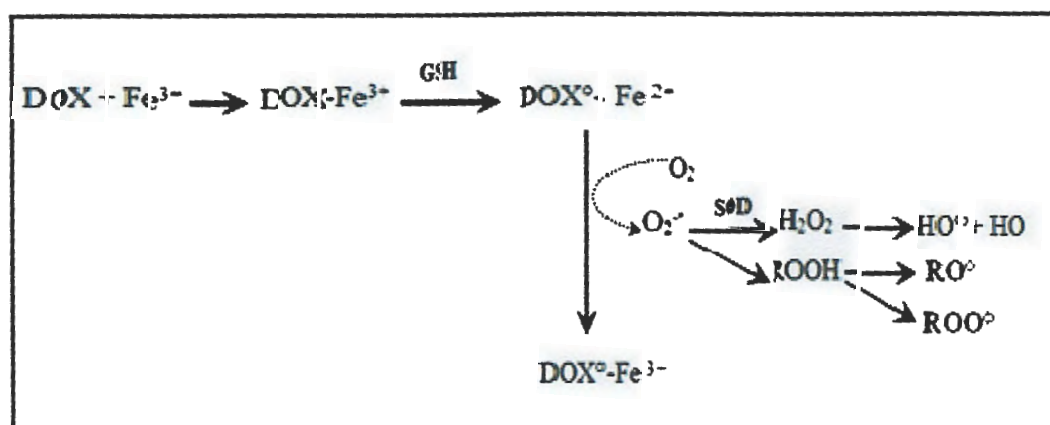


Figure 13: Voie non enzymatique de la formation des ROS par la DOX (Horenstein et al., 2000).

6.2. Altérations liée au stress oxydant engendré par la DOX

6.2.1. Toxicité rénales

Le rein est un organe fortement vulnérable aux dommages provoqués par les ROS, probablement due à l'abondance des acides gras polyinsaturés dans la composition des lipides rénaux (Rodrigo et Rivera, 2002). Ainsi, des taux élevés du MDA et du F2-isoprostane, deux produits de la peroxydation lipidique, ont été rapportés dans diverses situations associées aux altérations rénales (Rodrigo et Bosco, 2006). H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$, et OH^{\cdot} semblent être des médiateurs importants dans l'insuffisance rénale aiguë et dans les altérations glomérulaires et les altérations tubulo-interstitielles (Loru et al., 2009).

6.2.2. Toxicité cardiaque

Le cœur est un tissu caractérisé par un déficit relatif en défenses antioxydantes par rapport aux autres tissus (faible taux de la CAT, SOD, et un faible taux de renouvellement du glutathion). En outre, la DOX entraîne une inactivation de la glutathion peroxydase-1 (GSH-Px1), enzyme qui détoxifie la plupart du H_2O_2 (Delemasure et al., 2006).

Aussi, les cellules myocardiques sont très riches en mitochondries (représentent 50% du poids du cœur) d'où la présence d'un taux élevé dans les cardiomyocytes de cardiolipides, phospholipides constitutifs de la membrane mitochondriale interne; l'affinité élevée de la DOX pour les cardiolipides explique l'accumulation importante de la DOX à l'intérieur des cellules cardiaques (Alyane, 2010).

Chapitre 4

Matériel

&

Méthodes



Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de pharmacologie du département de biologie, à l'université de Jijel. Il est consacré à l'évaluation de l'effet de l'extrait de la plante *Thapsia garganica* d'Algérie contre un stress oxydatif rénal et cardiaque.

PARTIE 1 : ETUDE CHIMIQUE DE LA PLANTE

1. Matériel végétal

Différents organes (racines, feuilles, fleurs et fruits) de *Thapsia garganica* de la wilaya de Jijel ont utilisées dans cette étude.

Après nettoyage à l'aide d'une brosse sèche, les racines sont coupées en petites rondelles pour subir un séchage dans une étuve à 40°C pendant 3 à 4 jours à l'abri de l'humidité.

Les racines sèches sont broyées dans un mortier suivi d'un broyage électrique afin d'obtenir une poudre très fine qui va servir à l'extraction des polyphénols.

La partie aérienne (mélange de feuilles, fleurs et fruits), déjà sèche, a été juste réduite en de très petits morceaux étant donné qu'elle fera l'objet d'une extraction par macération.

2. Extraction

2.1. Racines

Les polyphénols sont solubles à chaud ou à froid dans les solvants organiques tels que, l'éthanol, le méthanol, etc. En pratique, pour extraire les polyphénols des racines, l'éthanol 70% à chaud est couramment utilisé (Gómez-Caravaca et al., 2006). On utilise pour cela un solvant à reflux dans extracteur du type soxhlet (Gerhardt Traditional Soxhlet System EV6All/16, Germany). Les vapeurs chaudes du solvant traversent la poudre dans une cartouche, se condensent plus haut dans un réfrigérant et retombent dans la cartouche contenant la poudre. Il y a alors macération et extraction des polyphénols de la poudre.

Lorsque le solvant remplit la cartouche, il y a siphonage et le solvant retombe dans le ballon d'ébullition. Le cycle continu jusqu'à l'extraction complète. Le solvant contenu dans le ballon est alors saturé en polyphénols extraits. Il suffit alors d'évaporer le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph Laborota 4003 control, Germany) pour recueillir les polyphénols et récupérer le solvant qui pourrait être réutilisé plusieurs fois.

Déroulement de l'expérience

10g de la poudre des racines sont introduits dans la cartouche, qui est ensuite placée dans le Soxhlet (Gerhardt Traditional Soxhlet System EV6All/16, Germany), tout en l'ayant recouvert avec du coton ou avec un linge propre et sec. 200ml du solvant d'extraction (éthanol 70%) sont introduits dans le ballon et la température est réglée à 50°C (éviter les surchauffes), puis l'extraction est lancée pendant une durée de 6 h (Jun et al., 2011).

A la fin de l'extraction, le macérât est d'abord filtré sur papier Whatman et le solvant est chassé par distillation à l'aide de l'évaporateur rotatif (Heidolph Laborota 4003 control, Germany).

Après l'évaporation complète du solvant, le ballon contenant l'extrait brut est pesé et le poids de l'extrait brut est obtenu par la différence entre le poids final et le poids initial du ballon. Le résidu est repris par 100 ml de l'eau distillée puis filtré par papier Whatman.

2.2. Partie aérienne

La préparation de l'extrait de *Thapsia garganica* à partir de la partie aérienne est réalisée à la température ambiante (macération).

44g de l'échantillon, coupé en petits morceaux, est extrait dans un volume de 300ml d'une solution éthanol/eau 70% (v/v) pendant 24 h.

Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après récupération des trois filtrats, une évaporation sous vide et à basse pression à l'évaporateur rotatif (Heidolph Laborota 4003 control, Germany). Le résidu sec est repris dans 100ml d'eau distillée suivit d'une filtration sur papier Whatman (Djeridane et al., 2007).

3. Séparation liquide-liquide

Cette étape permet de séparer les flavonoïdes selon leur structure et leur degré de polymérisation en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire (Kebièche et al., 2011):

- ❖ Epuisement par l'éther de pétrole;
- ❖ Epuisement par l'éther di-éthylique;
- ❖ Epuisement par l'acétate d'éthyle;
- ❖ Epuisement par le n-butanol.

Les épuisements sont réalisés dans des ampoules à décanter ; la phase aqueuse, contenant l'extrait brut, et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (au fond de l'ampoule) et la phase organique chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément.

La phase éther de pétrole, ne renfermant pas de composés phénoliques, est rejetée, quant aux autres phases, elles sont évaporées à basse pression à 40 °C (Heidolph Laborota 4003 control, Germany), les ballons sont pesés et le résidu est repris dans l'éthanol (2 à 4 ml). Les différents extraits obtenus sont conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à leur utilisation (Zeghad, 2009).

La formule suivante a été utilisée pour calculer le rendement (%) après chaque épuisement:

$$\text{Rendement} = [\text{Poids de l'extrait (g)} / \text{Poids de la partie de la plante utilisé (g)}] \times 100$$

4. Dosage des polyphénols totaux

4.1. Principe

L'évaluation des polyphénols totaux est réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi en 1965 (Waterhouse, 2002), qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 735 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (Georgé et al., 2005).

4.2. Déroulement du dosage

Brièvement, 500 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10^{ème} dans l'eau) sont ajoutés à 100 μL d'extrait dilué. Le mélange obtenu est laissé 5min à température ambiante, puis 400 μL de la solution de carbonate de sodium (75g/l) sont ajoutés. Après incubation à 20°C pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 735 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible (UV-mini 1240, SHIMADZU, China) contre un blanc.

La quantification des polyphénols est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (0 - 0.2 mg/ml) dans les mêmes conditions que les extraits.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec d'extrait (mg GEA /g extrait) (Boizot et Charpentier, 2006).

5. Dosage des flavonoïdes

5.1. Recherche qualitative des flavonoïdes

Ils sont recherchés dans tous les extraits obtenus après chaque épuisement de la phase aqueuse. La méthode employée est celle de *Shibata* ou réaction à la cyanidine utilisée pour identifier les flavonoïdes aglycones.

1ml de l'extrait à étudier est dissout dans du méthanol à 50%. On y ajoute un fragment de tournure de magnésium (0.5g) puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Il se produit une réaction exothermique mousseuse. À la fin d'une réaction positive il apparaît:

- ❖ une coloration rouge indiquant la présence des flavonols aglycones;
- ❖ une coloration orange indiquant la présence des flavonones aglycones (**Potchoo et al., 2008**).

5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) décrite par **Bahorun et al. (1996)**. La réaction est basée sur la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones des flavonoïdes, ce qui donne une coloration jaune dont l'intensité est quantifiée à 430 nm.

Déroulement du dosage

À 1 ml d'échantillon ou standard (préparé dans le méthanol) est ajouté 1ml de la solution d' AlCl_3 à 2% dans le méthanol. Après un repos de 10min, l'absorbance est lue à 430 nm contre le blanc réactif sans extrait.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 - 40 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions que les extraits.

La quantité de flavonoïdes correspond à la moyenne de 3 mesures sur un échantillon donné. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) (**Meziti, 2009**).

6. Etude du pouvoir anti-radicalaire des différents extraits

L'activité anti-radicalaire des extraits de la plante *Thapsia garganica* a été évaluée in vitro, par le test au DPPH°. Le DPPH° (2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette, vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2.2 diphényl-1-picryl hydrazine. La solution de DPPH° est préparée à l'avance (au moins 3 à 4h) car la solubilisation est difficile et ne se conserve pas plus de 48h à l'obscurité.

6.1. Méthode qualitative

Pour dépister qualitativement l'activité antioxydante des différents extraits de *Thapsia garganica*, une CCM (silica gel UV₂₅₄, support aluminium, 40x80 mm, Germany) a été effectuée. Le développant utilisé a été le gradient de solvants n-BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5; v/v/v). Après migration, le chromatogramme est giclé avec le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH, 0,1%), dissout dans de l'éthanol. La plaque chromatographique est ensuite séchée à la température ambiante pendant quelques minutes. L'apparition au visible de taches jaune-pâles sur fond violet (ou pourpre), témoigne de l'activité anti-oxydante (N'gaman Kohué et al., 2009).

6.2. Méthode quantitative

6.2.1. Principe

À 1.5 ml de solution éthanolique de DPPH° (100µM) sont additionnés 15µl d'extrait ou de la vitamine C (pris comme référence). Différentes dilutions de chaque extrait ainsi que de la vitamine C (voir annexe 3) sont testées afin de pouvoir déterminer la concentration inhibitrice minimale ou IC₅₀.

Après 30 minutes à l'obscurité, la réduction du DPPH° est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (517 nm). À cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant ou un autre radical, l'absorption diminue (Stankovic et al., 2010).

6.2.2. Calcul du pourcentage d'inhibition (%I) et de la concentration inhibitrice 50 (IC₅₀)

L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction du DPPH° en prenant le 100% du control (DPPH° seul) selon la relation suivante:

$$\%I = \left(\frac{A_C - A_E}{A_E} \right) \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle

A_E : Absorbance de l'essai



La concentration inhibitrice minimale (IC₅₀) est estimée par extrapolation à I = 50% en traçant la courbe % I = f ([concentration]).

PARTIE 2 : ETUDE IN VIVO**1. Animaux et conditions d'hébergement**

L'étude a été réalisée sur des rats femelles de souche *Wistar albinos* (Institut Pasteur d'Alger, Algérie) pesant environs de 140-180 g. Les rats sont maintenus dans une animalerie à température constante (22°C), hygrométrie de 60% et à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Ils sont placés dans des cages rectangulaires fabriquées en matière plastique opaque. Comme le protocole ne s'y oppose pas, les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau. Une pesée quotidienne des rats est réalisée avant, pendant et après le traitement.

2. Traitement

La doxorubicine (DOXOLEM RU, Mexique) est utilisée non pour son action anticancéreuse mais pour son effet néphrotoxique et cardiotoxique.

D'après les résultats de l'analyse chimique de la plante, l'extrait obtenu après épuisement de l'extrait brut de la partie aérienne avec l'acétate d'éthyle a été choisit pour explorer son éventuel effet protecteur contre l'effet délétère de la doxorubicine sur le cœur et le rein. Cet extrait a été élu car il présente l'activité anti-radicalaire la plus importante, $IC_{50}=2.81\text{mg/ml}$ (tableau 4).

Les animaux ont été répartis en 3 lots chacun de 3 rats:

- ✓ **Lot 1** ou lot témoin négatif : animaux recevant pendant 6 jours par voie intrapéritoniale (IP) une injection d'eau physiologique (NaCl 0.9 %).
- ✓ **Lot 2**: animaux recevant quotidiennement la solution physiologique (NaCl 0.9 %) par voie IP pendant 6 jours. La doxorubicine à raison de 15 mg/kg est administrée au 6^{ème} jour par voie IP.
- ✓ **Lot 3**: animaux recevant quotidiennement l'extrait dissout dans du NaCl (0.9%) par voie IP à raison de 10 mg/kg pendant 6 jours. La doxorubicine à la dose de 15 mg/kg est administrée au 6^{ème} jour.

3. Prélèvement du sang, sacrifice des animaux et prélèvement des organes (reins et cœur)

24 heures après l'administration de la doxorubicine, le sang est prélevé, avec un capillaire dans des tubes à hémolyse contenant EDTA, par ponction de la veine du sinus rétro-orbital.

Le sang est centrifugé à 3300 rpm pendant 10 min, le plasma est aliquoté puis congelé à -20°C pour l'analyse des paramètres biochimiques.

Les rats sont ensuite euthanasiés par inhalation des vapeurs du chloroforme, la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé et le cœur et les reins sont prélevés, pesés, et congelés à -20°C pour réaliser les dosages tissulaires.

4. Dosages biochimiques

4.1. Urée créatinine

Les taux plasmatiques de l'urée et de la créatinine sont estimés sur l'analyseur de biochimie semi-automatique (BSA 3000; France) en utilisant les kits BIOMAGHREB, le dosage est effectué selon les instructions du fabricant.

- Le dosage de l'urée sanguine est effectué en cinétique selon la méthode Berthelot modifiée basée sur la formation d'un complexe de couleur verte. Ce complexe est mesuré à 590 nm. La concentration d'urée plasmatique est exprimée en mmol/l.
- Le dosage de la créatinine sérique est effectué selon la méthode colorimétrique de Jaffé basée sur la formation d'un complexe coloré en présence d'un picrate alcalin. Ce complexe est mesuré à 492 nm. La créatinémie est exprimée en $\mu\text{mol/l}$.

4.2. Activités enzymatiques

Les activités plasmatiques des enzymes pour le diagnostic de l'atteinte cardiaque, à savoir la créatine kinase (CK), la transaminase glutamique oxaloacétique (TGO) et la transaminase glutamique pyruvate (TGP) ont été mesurées par spectrophotométrie en mode cinétique et point final sur automate (PHD: DIAM'S 2300+, analyseur de biochimie; Européen union) et en utilisant des kits SPINREACT, le dosage est effectué selon les instructions du fabricant. Les résultats sont exprimés en UI/l.

5. Dosage tissulaires

5.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) ou test TBARS (Ohkawa et al., 1978)

5.1.1. Principe

La réaction de dosage du MDA, décrite par Kohn et Liversedge, en 1944, précisée par Patton et Kuntz en 1951, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par

les solvants organiques comme le butanol. La réaction colorée, observée avec le TBA, mesure non seulement le MDA préexistant, mais aussi le MDA formé de manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction. Le résultat du dosage du MDA par le TBA est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec le TBA en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du MDA s'est substituée la notion de « substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS) (Lefèvre et al., 1998; Laguerre et al., 2007).

5.1.2. Déroulement de l'expérience

Le cœur et le rein sont plongés et lavés dans du NaCl 0.9% glacé (4°C) pour éliminer le sang puis coupé en morceaux et abondamment rincé à nouveau pour éliminer un maximum de sang et les morceaux de cœur et rein sont ensuite finement broyés dans un Potter en verre avec du KCl 1.15% (1 g tissu/ 9 ml KCl 1.15%).

À 0.5 ml de l'homogénat brut est ajoutés 0.5 ml de TCA 20% et 1 ml de TBA (0.67% dans NaOH 50 mM). Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15min, refroidi à l'eau de robinet pour stopper la réaction puis 4 ml de n-butanol sont ajoutés et le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 3000rpm. L'absorbance du surnageant est lue à 534nm contre un blanc fait avec 0.5ml d'eau distillée de la même façon que l'échantillon.

La valeur de TBARS est définie comme étant la quantité de MDA, exprimée en μM , présente dans 1 g d'échantillon.

5.2. Dosage du glutathion (Sedlak et Lindsay, 1967)

5.2.1. Principe

Pour l'évaluation du taux de glutathion réduit chez les rats, nous avons utilisé la méthode de Sedlak et Raymond 1967 utilisant le réactif d'Ellman. Il s'agit d'une réaction chimique évoluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique.

Le réactif d'Ellman: acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB est réduit par les groupes thiol (SH) pour donner une mole d'acide 2-nitro-5-mercaptopbenzoïque par mole de SH. L'acide mercaptopbenzoïque est un anion ayant une intense coloration jaune et par conséquent peut être utilisé pour évaluer les groupes thiols (SH).

5.2.2. Déroulement de l'expérience

0.4 g de cœur sont coupés et homogénéisés dans 8ml EDTA 0.02M. A 0.5 ml de l'homogénat sont ajoutées 1.5 ml de tampon Tris 0.2M (pH8.2 dans EDTA 0.02M) et 0.1ml de DTNB 0.01M en méthanol absolu. Le volume est complété à 10 ml par du méthanol absolu, puis incubé pendant 15min à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 3000rpm pendant 15min. L'absorbance du surnageant est lue à 412 nm contre le blanc (0.5 ml eau distillée + 1.5 ml 0.2M Tris + 0.1 ml DTNB 0.01M).

6. Dosage des enzymes antioxydantes dans le cytosol

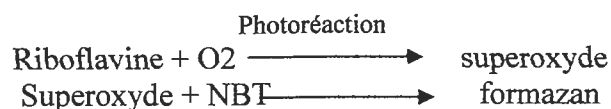
6.1. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par **Iqbal et al. (2003)**. Pour cela, 0.5 g du rein (cœur) sont coupés et homogénéisés avec trois (03) volumes de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,4) contenant du KCl à 1,17 % à l'aide d'un homogénéisateur de DOUNCE. L'homogénéisation est réalisée à 4°C. L'homogénat obtenu est centrifugé à 2000rpm pendant 15 minutes à 4 °C (centrifugeuse 55702 BIOBLOCK SCIENTIFIC; Italy) pour séparer les débris nucléaires. Le surnageant obtenu est centrifugé à 9600rpm pendant 30 minutes à 4°C (Centrifugeuse Sigma 1-14; Germany), et le surnageant final est utilisé comme source enzymatique.

6.2. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) cytosolique

6.2.1. Principe

L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de **Beauchamp et Fridovich (1971)**. Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitrobleu-tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électrons comme la méthionine selon la réaction suivante:



6.2.2. Déroulement du dosage

2 ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10^{-2} M, solution du NBT 1.76×10^{-4} M, EDTA 66×10^{-3} M et la riboflavine 2×10^{-6} , pH 7.8) et 100 µl de la méthionine 10^{-2} M sont additionnés à 5 µl de la source enzymatique. Le mélange est irradié avec une lampe de 15 Watt pendant 10 mn pour induire la photoréaction de la riboflavine et de l'O₂.

La réduction de NBT par l'anion superoxyde en formazan est suivie par le spectrophotomètre en mesurant la densité optique (DO) à 560 nm.

Une unité de SOD correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber la photoréduction de 50% du NBT.

$$\%inhibition = \left(\frac{DO_{control} - DO_{essai}}{DO_{control}} \right) \times 100$$

$$SOD(UI/ml) = \%inhibition \times 6.35$$

Le control est préparé dans les mêmes conditions que l'essai mais sans source enzymatique.

6.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique

6.3.1. Principe

L'activité catalasique a été mesurée selon la méthode **Claiborne (1985)** par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution d' H_2O_2 après addition de l'extrait cellulaire, mesurée à 240 nm pendant 1 min à 25 °C, cette diminution étant due à la dismutation du peroxyde d'hydrogène par la catalase selon la réaction :



6.3.2. Déroulement du dosage

Dans un volume final de 2 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0.1M, pH7.2), on ajoute 0.950ml de peroxyde d'hydrogène (0,019 M). La réaction est déclenchée par addition de 0.025 ml de la source d'enzyme (le cytosol). L'absorbance est lue à 240 nm chaque minute pendant deux (02) minutes.

La catalase étant une enzyme à cinétique non michaélienne, donc non saturable, l'activité catalase sera estimée en calculant la constance de vitesse de premier ordre de disparition de H_2O_2 (**Aebi, 1982**). La constance de vitesse de disparition de H_2O_2 (k) est définie telle que :

$$K = \frac{2.3033}{T} \text{Log} \left(\frac{DO_1}{DO_2} \right) (\text{sec}^{-1})$$

Avec :

- ✓ T ⇒ Durée de la mesure (sec)
- ✓ DO_1 ⇒ Densité optique à l'instant t_0
- ✓ DO_2 ⇒ Densité optique à l'instant t.

6.4. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) cytosolique

6.4.1. Principe

L'activité enzymatique de la GST est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**. Elle est étudiée en cinétique. Le substrat utilisé est le chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95°. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électron ($\text{GSH} = \text{GS}^- + \text{H}^+$) sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton (attaque électrophile). La mesure de l'activité enzymatique est effectuée au spectrophotomètre à 340 nm et à 25°C.

6.4.2. Déroulement du dosage

Dans la cuve de mesure, on introduit 1.7 ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1 M, pH = 6.5), 100µl de CDNB (20 mM). Après 10min d'incubation à 37°C, 100 µl de glutathion (20 mM) et la réaction est déclenchée par addition de 100µl de cytosol. L'augmentation de l'absorbance à 340nm est enregistrée pendant 5minutes.

L'activité enzymatique de glutathion S-transférase, exprimée en UI/ml, a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) selon la relation suivante:

$$\text{Activité (UI / ml)} = \frac{\left(\frac{\Delta \text{DO}_{(340\text{nm})}}{T} \right)_E - \left(\frac{\Delta \text{DO}_{(340\text{nm})}}{T} \right)_B \times V_t \times F}{\epsilon \times V_{ez}}$$

Avec :

- ✓ $\Delta \text{DO}_{(340 \text{ nm} / T)E}$: différence de l'absorbance échantillon;
- ✓ V_t : volume réactionnel total (ml);
- ✓ V_{ez} : volume de la fraction cytosolique ajouté (ml);
- ✓ F: facteur de dilution.
- ✓ B : blanc, préparé de la même manière que l'échantillon sauf qu'à la place de la fraction cytosolique, on utilise de l'eau distillée.

7. Dosage des protéines (Bradford, 1976)

7.1. Principe

Cette méthode mesure la concentration protéique, elle est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu brillant de coomassie G250 qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon.

7.2. Déroulement du dosage

100 µl de la fraction cytosolique du tissu (cœur et rein), dilués à 1/5^{ème} avec de l'eau distillée, sont ajoutés à 4 ml du réactif de Bradford (BBC). Après agitation, le mélange est incubé 5min à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à 595nm contre le blanc réactif.

La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée à partir d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons avec de l'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations connues (0- 4 mg/ml).

8. Etude statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne \pm écart-type. Ces résultats sont traités statistiquement par des tests t de Student à l'aide du logiciel Excel 2007 afin de déterminer s'il existait des différences significatives entre les valeurs des différents échantillons. Toutes les analyses sont réalisées au seuil de signification de 5%.

Pour les valeurs expérimentales aberrantes, le test de rejet de Dixon a été réalisé afin de décider de garder ou non ces valeurs. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé.

Pour la p-valeur, des étoiles (*) sont utilisées afin d'indiquer l'importance de la signification pour la comparaison des différents échantillons avec les rats témoins. Des (#) sont utilisées afin d'indiquer l'importance de la signification pour la comparaison des différents échantillons avec les rats traités par la doxorubicine:

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative (ns);
- $p < 0,05$ = la différence est significative (*) ou (#);
- $p < 0,01$ = la différence est très significative (**) ou (##);
- $p < 0,001$ = la différence est hautement significative (***) ou (###).

Chapitre 5

Résultats

&

Interprétation

Résultats et Interprétation

Partie 1 : Etude chimique de la plante

1. Extraction

1.1. Préparation des extraits à partir des racines et de la partie aérienne (PA) de la plante

Thapsia garganica

L'extraction des polyphénols à partir des racines et de la partie aérienne de la plante a été effectuée en deux étapes: la 1^{ère} étape est une extraction par un mélange hydroalcoolique éthanol/eau (7/3; V/V) pour obtenir initialement l'extrait brut, et la 2^{ème} étape de fractionnement, consistant en une série d'épuisement, fut réalisée par l'utilisation de solvants à polarité croissante (éther di-éthylique, acétate d'éthyle, n-butanol). Le rendement de l'extraction et de chaque épuisement est représenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Rendements d'extraction des diverses fractions extraites à partir des racines et de partie aérienne de la plante *Thapsia garganica*.

Extrait	Racines		Partie aérienne	
	Rendement (%) (par rapport au poids du broyat)	Rendement (%) (par rapport au poids de l'extrait brute)	Rendement (%) (par rapport au poids du broyat)	Rendement (%) (par rapport au poids de l'extrait brute)
Brute	25.85	100	19.38	100
Ether di-éthylique	1	3.86	0.7	3.61
Acétate d'éthyle	5.6	21.66	0.5	2.58
N-butanol	1.8	6.96	2.3	11.87
Aqueux	13.7	52.99	7.9	40.76

Les données expérimentales du tableau 1 montrent que :

- **Racines** : par rapport au poids du broyat, l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé (13.7%) suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (5.6%) puis l'extrait butanolique (1.8%) et le rendement le plus faible (1%) est obtenu par l'extrait d'éther éthylique, la même chose est observée lors de la comparaison des rendements des différents extraits par rapport à l'extrait brut (qui représente 25.85% du poids total de matière sèche), ces

rendements sont de 52.99%, 21.66%, 6.96%, 3.86% pour l'extrait aqueux, l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait butanolique et l'extrait d'éther di-éthylique respectivement.

- **Partie aérienne** : le rendement le plus élevé est toujours représenté par l'extrait aqueux (7.9%) suivi cette fois de l'extrait butanolique (2.3%) puis l'extrait d'éther éthylique (0.7%) et l'extrait d'acétate d'éthyle représente le rendement le plus faible (0.5%). La même chose est observée lors de la comparaison des rendements des différents extraits par rapport à l'extrait brut (qui représente 19.38% du poids total du matière sèche), ces rendements sont de 40.76%, 11.87%, 3.61%, et 2.58% pour l'extrait aqueux, l'extrait butanolique, l'extrait éther di-éthylique et l'extrait d'acétate d'éthyle respectivement.

2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Après extraction et dosage, les teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes dans les différentes phases étudiés, sont représentés dans le tableau 3.

On remarque que les différentes phases étudiées, aussi bien celles obtenues à partir des racines que de la PA de la plante comportent des polyphénols. Cependant, certaines phases sont plus riches que d'autres ce qui laisse suggérer que certains solvants sont mieux adaptés que d'autres.

Les données expérimentales montrent que la PA de la plante est plus riche en composés phénoliques que les racines. Par exemple, l'extrait brut de la PA est 3.64 fois plus riche en polyphénols que le même extrait obtenu à partir des racines.

Pour les racines, c'est l'éther di-éthylique qui semble mieux adapté à l'extraction des polyphénols étant donné qu'il a permis l'obtention du taux le plus élevé par rapport aux autres solvants, alors que la phase aqueuse a donnée la teneur la plus faible (0,66 mg EAG/g d'extrait), résultats attendu vu qu'elle a subi plusieurs épaissements.

L'analyse des données portant sur la PA, révèle d'une part la richesse en composés phénoliques, et que c'est l'acétate d'éthyle qui a permis l'extraction de la majorité des polyphénols par rapport aux autres solvants (Tableau 3).

Tableau 3: Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits de racines et de la partie aérienne de la plante *Thapsia garganica*.

Extrait	Racines		Partie aérienne	
	Teneur en polyphénols totaux (a)	Teneur en flavonoïdes (b)	Teneur en polyphénols totaux (a)	Teneur en flavonoïdes (b)
Brute	1,04	0,042	3,79	0,012
Ether di-éthylique	7,31	0,073	5,98	0,053
Acétate d'éthyle	1,94	0,013	21,97	9,66
n-butanol	6,36	0,064	5,56	0,031
Aqueux	0,66	0,007	1,04	0,008

(a) mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait).

(b) µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg extrait).

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± écart type.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la quercétine montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde et l'absorbance (figure 2, Annexe 2).

Le dosage révèle que l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne reste l'extrait le plus riche même en flavonoïdes avec une teneur de (9,66 µg EQ/mg d'extrait), alors que les autres extraits contiennent des faibles teneurs, il est suivi de l'extrait d'éther di-éthylique (5,98 µg EQ/mg d'extrait), ensuite l'extrait butanolique (5,56 µg EQ/mg d'extrait) et en fin l'extrait brute et l'extrait aqueux respectivement (3,79 et 1,04 µg EQ/mg d'extrait). Pour les racines, l'extrait d'éther di-éthylique contient la teneur élevée (0,073 µg EQ/mg d'extrait), suivi de l'extrait butanolique (0,064 µg EQ/mg d'extrait), ensuite l'extrait brute (0,042 µg EQ/mg d'extrait) et en fin l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux qui contiennent respectivement 0,013 et 0,007 µg EQ/mg d'extrait, cette dernière valeur représente la teneur la plus faible dans toutes les teneurs des extraits (Tableau 3).

3. Identification des flavonoïdes par la réaction de Shibata

La réaction de Shibata était positive, elle a donné une coloration rouge-orangé avec les extraits bruts, les extraits butanoliques et les extraits d'acétate d'éthyle, et une coloration orange avec les extraits d'éther di-éthylique, ce qui indique la présence des aglycones flavoniques (flavonols et/ou flavonones). La réaction était négative avec les extraits aqueux (aucune coloration).

4. Etude de l'activité antiradicalaire par le test au DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)

Cette propriété a été évaluée par la technique de décoloration du DPPH qui démontre que le potentiel antioxydant de la plante est avéré.

4.1. Méthode qualitative (CCM)

La révélation de la plaque par la solution éthanolique de DPPH^o est une CCM de criblage qui permet l'obtention de renseignements supplémentaires sur l'activité antioxydante des différents composants des extraits testés (fig. 14).

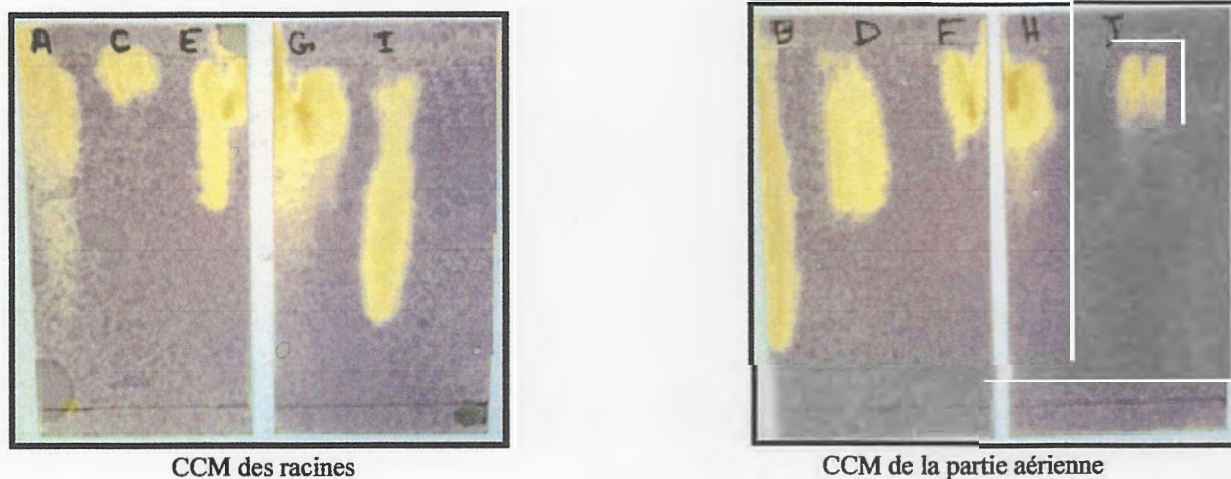


Figure 14: Profil chromatographique du screening de l'activité anti-radicalaire des extraits de racines et de la partie aérienne de la plante *Thapsia garganica* développant n-BuOH/ AcOH/ H₂O (4/1/5 ; v/v/v) A et B: Extraits brutes. C et D: Extraits d'éther di-éthylique. E et F: Extraits d'acétate d'éthyle. G et H: Extraits butanolique. I et J: Extraits aqueux.

La Figure 14 met en évidence la présence de spots jaune-pâle sur fond violet. Ce qui dénote que les différentes phases renferment des phytoconstitués susceptibles de piéger des ROS.

4.2. Méthode quantitative

Après incubation avec le DPPH° à différentes concentration, les cinétiques de décoloration à 517 nm ont été déterminées.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits des racines et de la partie aérienne de *Thapsia garganica* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les IC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées (Tableau 4 et annexe 3).

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé; l'acide ascorbique (vitamine C).

Tableau 4: Activité antiradicalaire des extraits de la plante *Thapsia garganica*

Extrait	IC ₅₀ (mg/ml)	
	Racines	Partie aérienne
P'extrait brut	19.16	20.89
P'extrait d'éther diéthylique	7.81	4.78
P'extrait d'acétate d'éthyle	4.22	2.81
P'extrait <i>n</i> -butanol	4.60	4.78
P'extrait aqueux.	30.65	28.28
Vitamine C	0.18	

On remarque que toutes les phases testées présentent une capacité de capture des radicaux libres, et que cette aptitude antiradicalaire est nettement inférieure à celle de la vitamine C, prise comme référence (Tableau 4). Pour pouvoir comparer Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec une IC₅₀ de l'ordre de 0.18mg/ml.

Parmi les cinq extraits de la partie aérienne et des racines de *Thapsia garganica*, l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne est le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de 2.81mg/ml étant donné qu'il est le plus riche en composés phénoliques. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par les extraits aqueux des deux partie (IC₅₀=28.28 pour l'extrait de la partie aérienne, IC₅₀=30.65 pour l'extrait des racines) qui sont 10 fois moins actifs que l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne, résultat attendu car cette phase à subit plusieurs affrontements afin d'extraire les éventuels composés actifs. Une activité intermédiaire a été obtenue avec les autres extraits.

Partie 2 : Etude *in vivo*

1. Effet de la doxorubicine sur l'évolution du poids corporel

L'évolution pondérale est caractérisée par une réduction du gain pondéral chez les rats traités par une dose aiguë de doxorubicine (15mg/kg). Le jour du sacrifice, la valeur moyenne du poids corporel des rats traités (Fig.15) était de 163.5 ± 2.12 g, poids moyen après l'injection de doxorubicine, contre 169.1 ± 1.55 g, poids moyen avant l'injection de doxorubicine ($p < 0.05$), ceci s'expliquerait par une éventuelle anorexie chez les animaux.

Chez les rats témoins, recevant une injection IP de NaCl 0.09% (Fig.15), les valeurs moyennes du poids corporel avant l'injection de la solution de NaCl 0.09% 184.67 ± 2.37 g *versus* 189.92 ± 1.64 g, valeur moyenne après le traitement ($p < 0.01$), montrant que l'appétit des rats n'a pas été affectée par l'administration de NaCl 0.9%.

D'autre part, l'administration pendant 6 jours de l'extrait de *Thapsia garganica* à raison de 10 mg/kg (Fig.15) n'a pas affecté négativement la prise du poids corporel, on note une augmentation très significative ($p < 0.01$) du poids des rats après traitement, 175.33 ± 3.43 g *versus* 168.33 ± 1.41 g avant traitement.

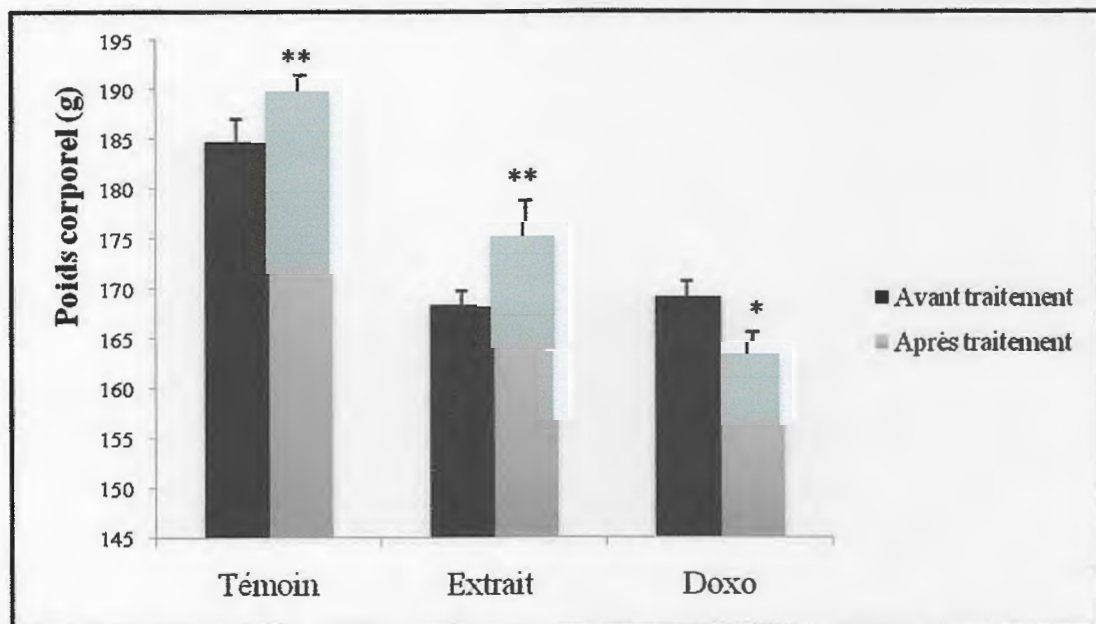


Figure 15: Effet du prétraitement par l'extrait de *Thapsia garganica* à 10 mg/kg, et du traitement par une dose aiguë de 15 mg/kg de la doxorubicine sur le poids corporel des rats. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$).

2. Effet de la doxorubicine sur quelques paramètres biochimiques

En pathologie, l'augmentation de la destruction cellulaire normale ou cytolyse pathologique des cellules myocardiques et rénales entraîne une augmentation de l'activité de certains enzymes dans le plasma est un reflet précoce de lésions myocardiques et rénales. Aussi

des perturbations de certains paramètres (urée, créatinine) reflètent aussi l'éventuelle atteinte rénale.

2.1. Atteinte rénale

2.1.1. Urée sanguine

Comme le montre la figure 16, la doxorubicine a entraînée une atteinte rénale reflétée par une augmentation très significative ($p < 0.01$) du taux d'urée sanguine chez le lot traité par la doxorubicine seule (15 mg/kg), et où la concentration atteint 8.88 ± 0.98 mmol/l par rapport à une concentration de 4.94 ± 1.18 mmol/l chez le témoin. Cependant l'association de la doxorubicine avec l'extrait du *Thapsia garganica* (10 mg/kg) montre une diminution significative des taux de l'urée sérique (6.60 ± 0.1 mmol/l contre 8.88 ± 0.98 mmol/l chez le lot traité par la doxorubicine seul) ($p < 0.01$). Ceci laisse suggérer l'éventuel effet protecteur de l'extrait.

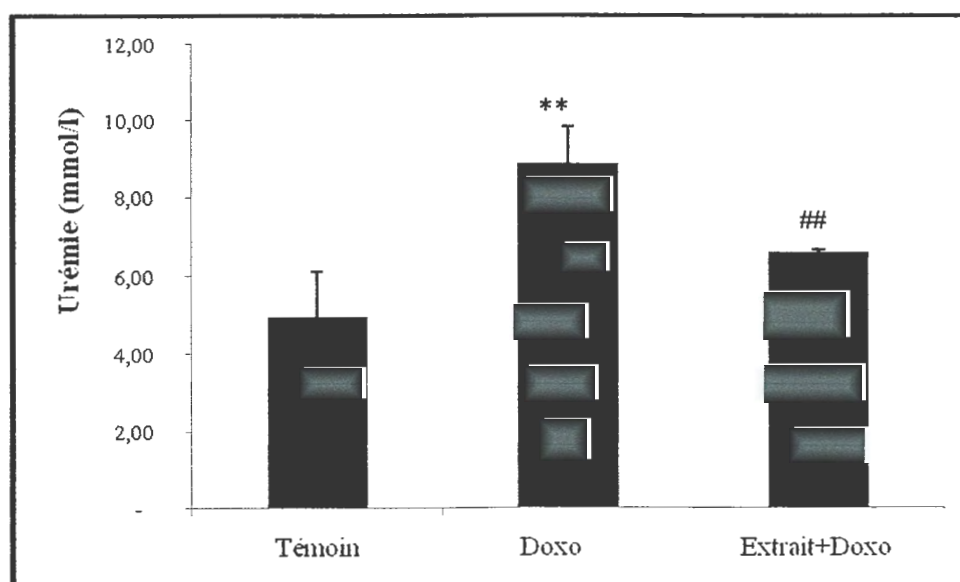


Figure 16: Effet de la doxorubicine et de l'extrait végétal sur les taux sériques de l'urée. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$).

2.1.2. Créatinine sérique

Les concentrations de la créatinine sériques des animaux ayant reçus des différents traitements sont rassemblées dans la figure 17. On note une augmentation significative ($p < 0.01$) par rapport au lot témoin ($54.51 \pm 0.89 \mu\text{mol/l}$) chez le lot traité par la doxorubicine seule où la concentration atteint $56.38 \pm 0.85 \mu\text{mol/l}$. Les résultats montrent une diminution significative de la créatinémie du lot traité par l'extrait associé avec la doxorubicine ($50.58 \pm 1.37 \mu\text{mol/l}$) par rapport au lot traité par la doxorubicine seul ($p < 0.01$).

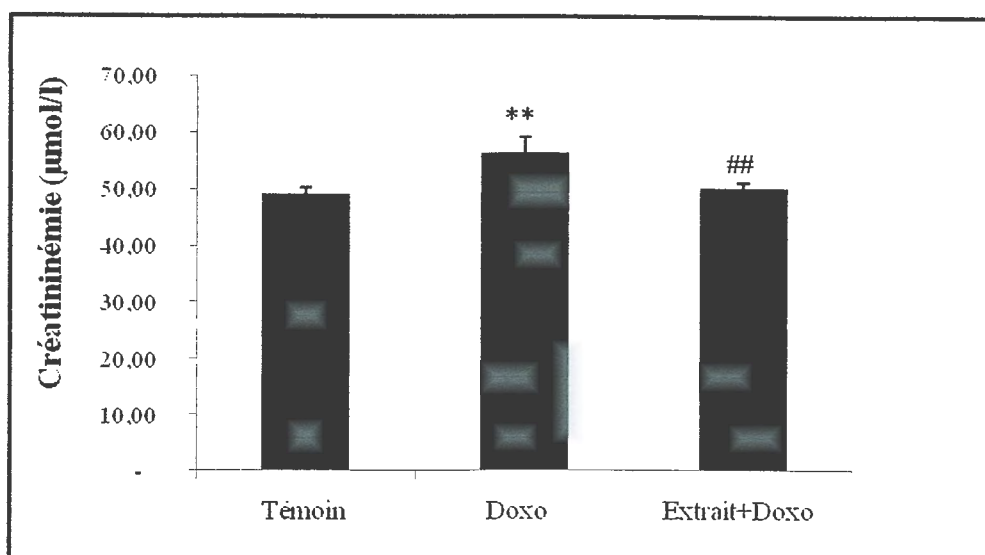


Figure 17: Variation des taux de la créatinine sérique après traitement par la doxorubicine et l'extrait végétal de *Thapsia garganica*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

2.2. Atteinte cardiaque

2.2.1. Activité de la créatine kinase (CK)

La figure 18 montre une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité du CK chez le lot traité par la doxorubicine seule (231.87 ± 27.35 UI/l) contre 53.58 ± 14.62 UI/l chez le lot témoin confirmant l'atteinte cardiaque.

Le prétraitement des rats par l'extrait de *Thapsia garganica* semble être sans effet contre l'effet néfaste de la doxorubicine sur le cœur; on note que ce prétraitement n'a pas protégé le cœur, le taux de CK reste élevé et la différence est hautement significative par rapport au lot témoin ($p < 0.001$).

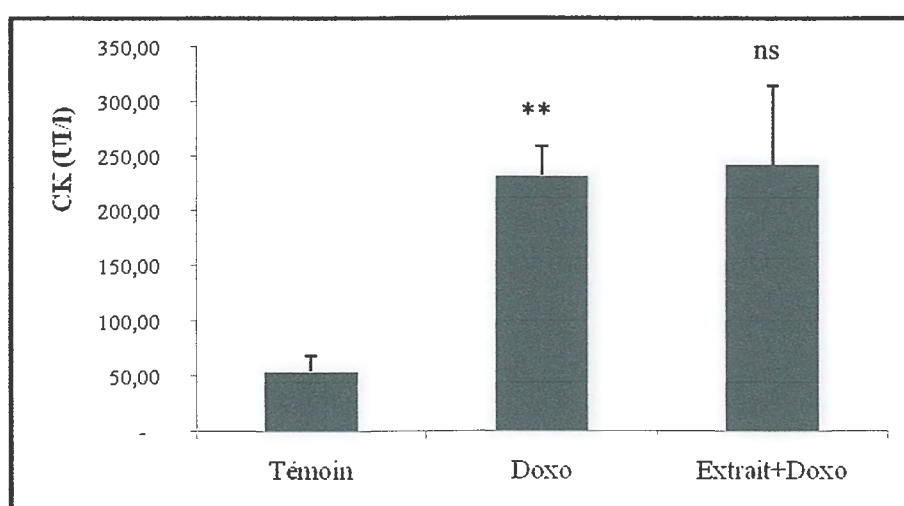


Figure 18: Evolution de l'activité de la créatine kinase après administration de la doxorubicine et le prétraitement par l'extrait du *Thapsia garganica* (10 mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

2.2.2. Activité de la transaminase glutamique oxaloacétique (TGO)

Les résultats de l'activité enzymatique des TGO sont rassemblés dans la figure 19. Le traitement des rats par la doxorubicine seul montre une augmentation très significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique du TGO, qui atteint 99.41 ± 9 UI/l par rapport aux rats témoins (73.04 ± 7.55 UI/l), résultat confirmant l'atteinte cardiaque.

Association de la doxorubicine avec l'extrait de *Thapsia garganica* (10 mg/kg pendant 6 jours) montre une augmentation très significative de l'activité du TGO, qui atteint 123.83 ± 4.12 UI/l, par rapport au lot traité par la doxorubicine seul et au lot témoin ($p < 0.01$). Ce résultat, contredisant ce lui de la CK, laisse penser la possibilité de l'existence d'un éventuel effet toxique de notre extrait ; à priori, ce taux élevé est due à une hémolyse de l'échantillon sanguin.

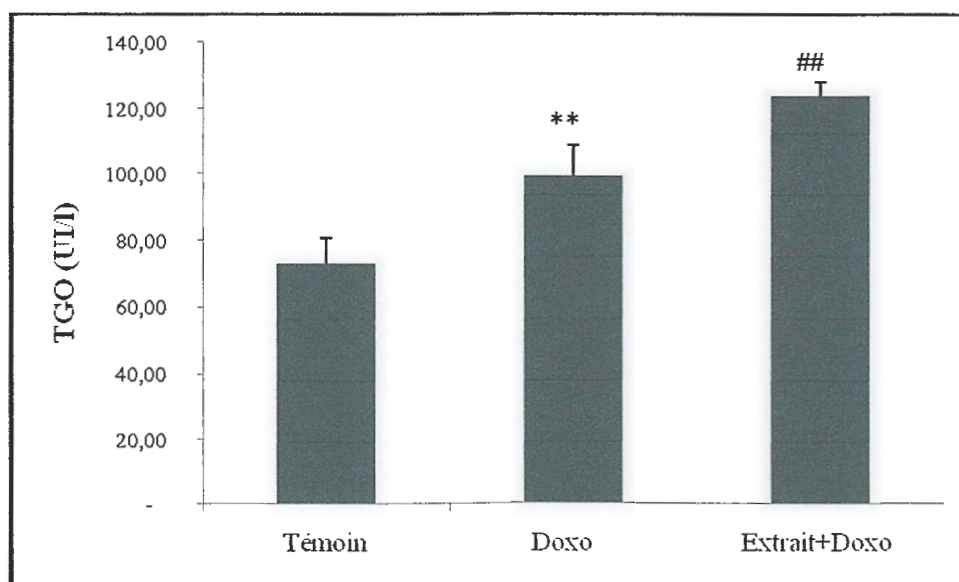


Figure 19: Variation de l'activité enzymatique de la TGO après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$)

2.2.3. Activité de la transaminase glutamique pyruvate (TGP)

Les résultats de l'activité enzymatique des TGO sont rassemblés dans la figure 20. Les valeurs moyennes des activités enzymatiques de la TGP des rats traités par la doxorubicine étaient 50.69 ± 1.15 UI/l contre 44.37 ± 1.80 UI/l chez les rats du lot témoin. Cette augmentation est statistiquement très significative ($p < 0.01$), données corroborant l'atteinte cardiaque.

Le prétraitement par l'extrait de *Thapsia garganica* semble être sans effet contre l'effet délétère de la doxorubicine sur le cœur, étant donné que ce prétraitement a entraîné plutôt une augmentation du taux de TGP. Ce résultat s'expliquerait par l'hémolyse observée sur l'échantillon servant à la mesure de l'activité enzymatique.

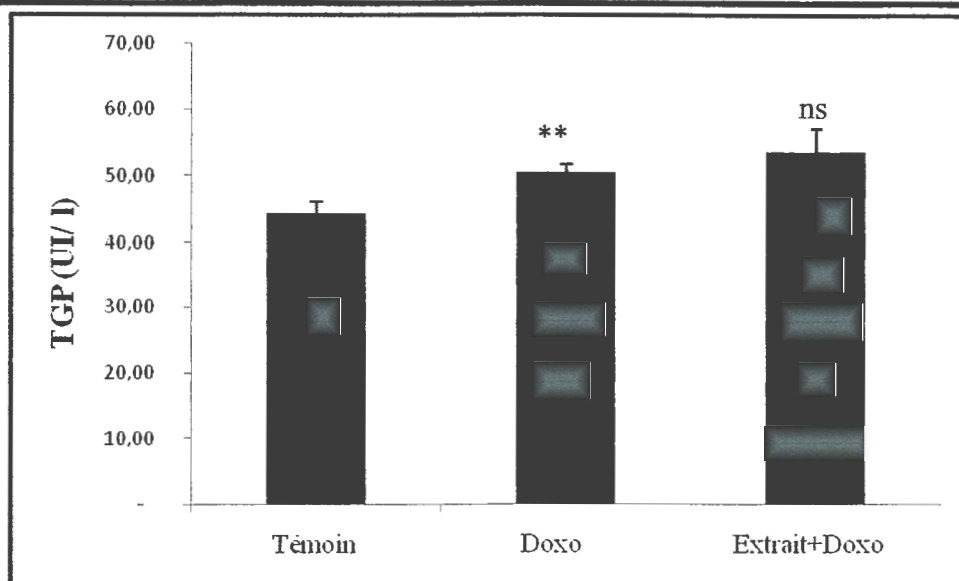


Figure 20: Variation de l'activité enzymatique de la TGP après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$)

3. Effet de l'extrait sur les indicateurs tissulaires du stress oxydant

3.1. Peroxydation lipidique

Ils existent de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique dont le malondialdéhyde (MDA) est sans doute le plus connu et le plus utilisé. Nos résultats (Figure 21a et 21b) montrent une augmentation du taux de TBARS chez les rats traités avec une dose aiguë de doxorubicine (15mg/kg) par rapport aux rats témoins ($p < 0.001$). Le taux de MDA atteint $11.61 \mu\text{M}$ contre $4.34 \mu\text{M}$ chez les témoins après 24h pour le tissu cardiaque, et $30.5 \mu\text{M}$ contre $17.26 \mu\text{M}$ chez les témoins pour le tissu rénal.

Cependant on note chez les animaux traités préventivement pendant 6 jours par l'extrait d'acétate d'éthyle (10mg/kg) par voie intra péritonéale un taux du MDA équivalent à ceux du témoin.

Le prétraitement par l'extrait d'acétate d'éthyle (10mg/kg) (IP) pendant 6 jours a entraîné une réduction significative de TBARS chez les rats ($p < 0.05$).

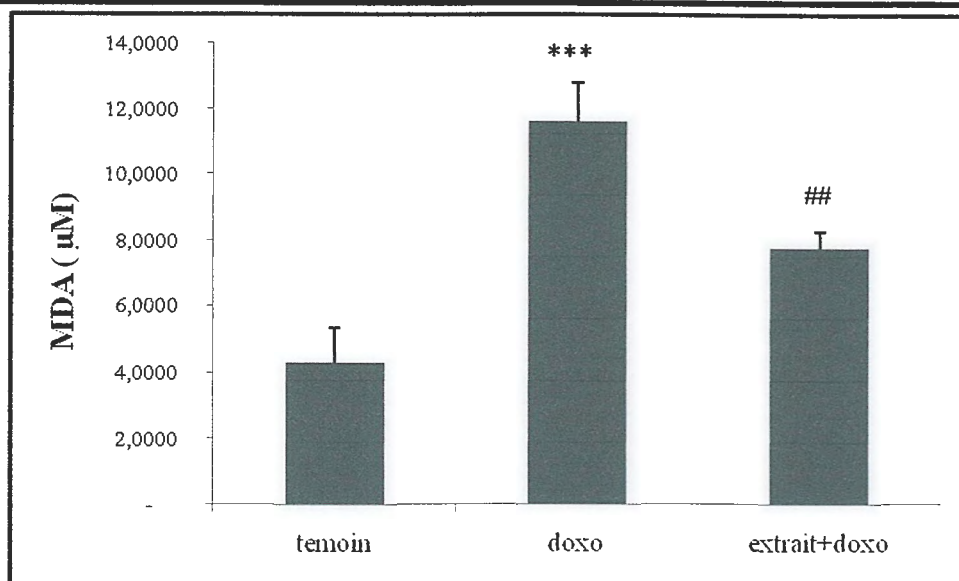


Figure 21a : Variation du taux du MDA dans le cœur après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

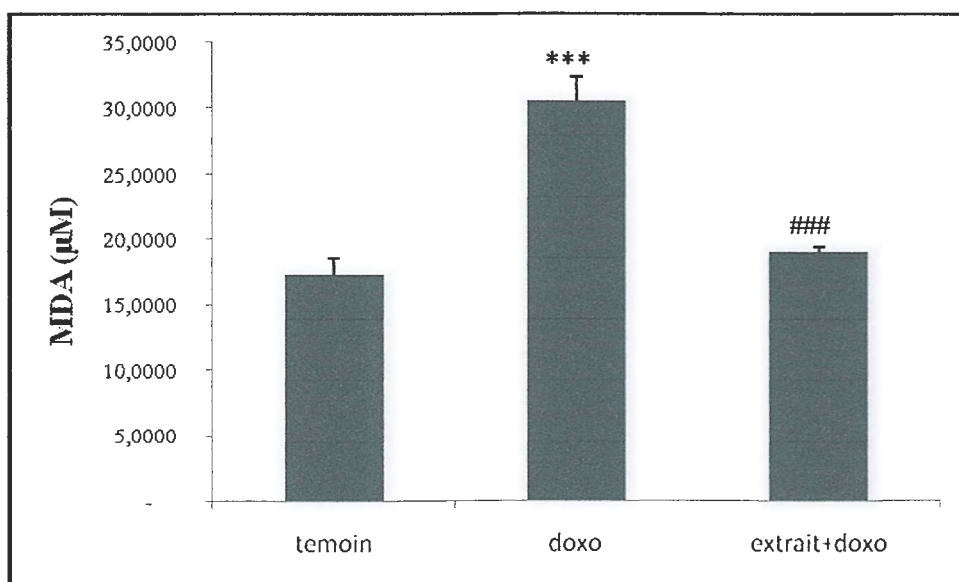


Figure 21b: Variation du taux du MDA dans les reins après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

3.2. Variations du taux de glutathion (GSH)

L'évaluation des taux du GSH dans le cœur et les reins après traitement par la doxorubicine (15mg/kg) seule ou associée avec l'extrait d'acétate d'éthyle (10mg/kg) et sont représentés dans la figure 22a et 22b.

Les rats traités par la doxorubicine montrent une diminution significative ($p < 0.05$) de la concentration cardiaque en GSH (fig. 22a) ($0.0903 \mu\text{M}$ contre $0.1075 \mu\text{M}$ chez les témoins), résultat attendu, vu que cet organe est connu pour ses faibles réserves en antioxydants.

Le prétraitement par l'extrait végétal restaure significativement les réserves tissulaires en GSH ($p < 0.05$).

Au niveau du rein, la doxorubicine ne semble pas provoquer une déplétion du taux du GSH ($p > 0.05$), étant donné que les valeurs du GSH rénal chez le lot traité par la doxorubicine sont dans les normes physiologique (variation entre $0.0750 \mu\text{M}$ et $0.0762 \mu\text{M}$) (fig. 22b).

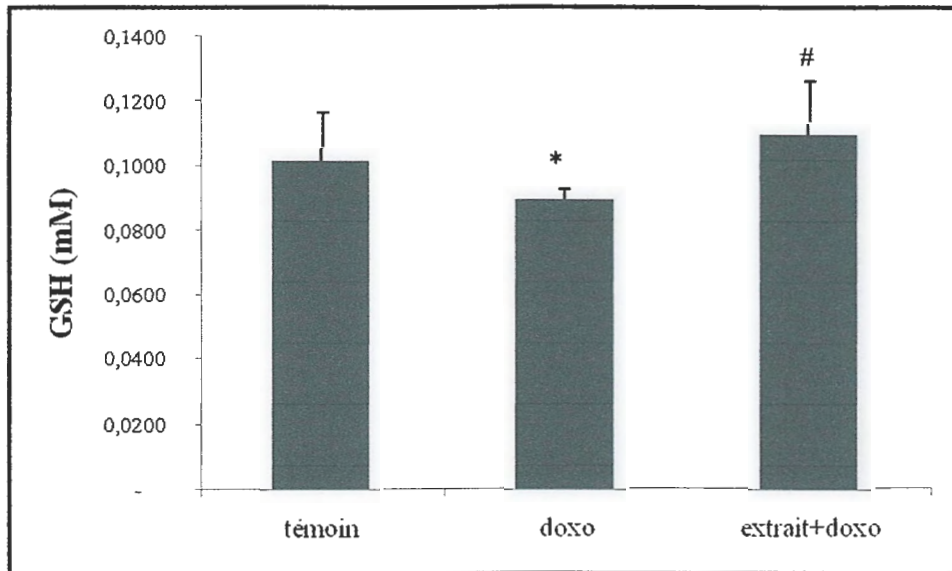


Figure 22a : Variation du taux de GSH dans le coeur après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$).

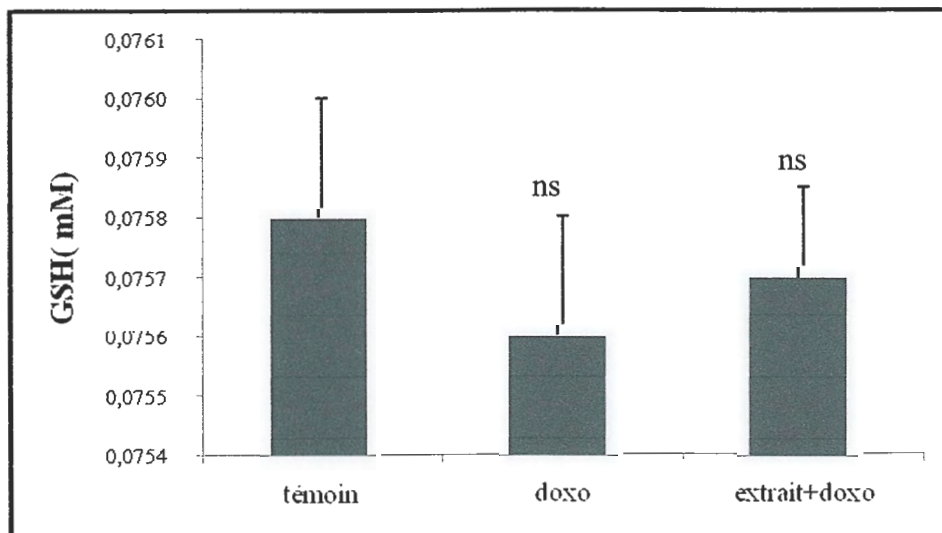


Figure 22b : Variation du taux de GSH dans les reins après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$).

3.3. Variation de l'activité des enzymes antioxydants

Les graphiques décrivant l'évolution des activités du superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion S-transférase au cours du stress induit par la doxorubicine sont présentés dans les figures 23,24 et 25.

Concernant l'évolution de l'activité de la GST (Fig. 23a et 23b), l'examen statistique des données a permis de révéler que la doxorubicine seule a entraîné une augmentation significative de l'activité de cet enzyme, qui intervient dans la réduction du peroxyde d'hydrogène produit suite à l'administration de la doxorubicine. Il se peut que le H₂O₂ induit une synthèse de la GST d'où cette augmentation d'activité.

Par contre le prétraitement des rats par l'extrait végétal à entraîne une réduction significative de l'activité de l'enzyme ($p < 0.05$), ceci s'expliquerait non par le fait que l'extrait a inhibé l'enzyme, mais par l'activité antioxydante de ce dernier qui semble avoir désactivé les ROS produits par la doxorubicine et par conséquence le faible taux de ROS restants se rime bien avec une faible activité de la GST.

Au niveau rénal, la doxorubicine semble inhiber significativement ($p < 0.05$) l'activité de la GST alors que l'extrait la restore.

Comme le montre les figures 24a et 24b, la doxorubicine semble inhiber significativement l'activité de la CAT au niveau cardiaque et rénal alors que le prétraitement par l'extrait de la plante entraîne une très forte induction de l'activité catalasique.

Quant à la SOD, son évolution au cours de notre étude suit le même profil que la CAT (figures 25a et 25b).

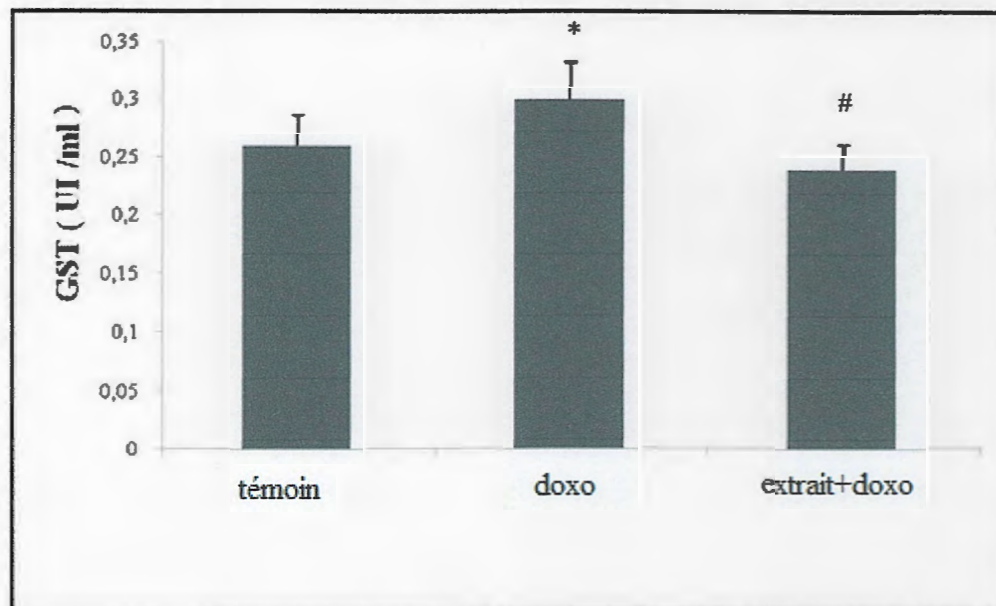


Figure 23a: Variation de l'activité enzymatique de la GST dans le coeur après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

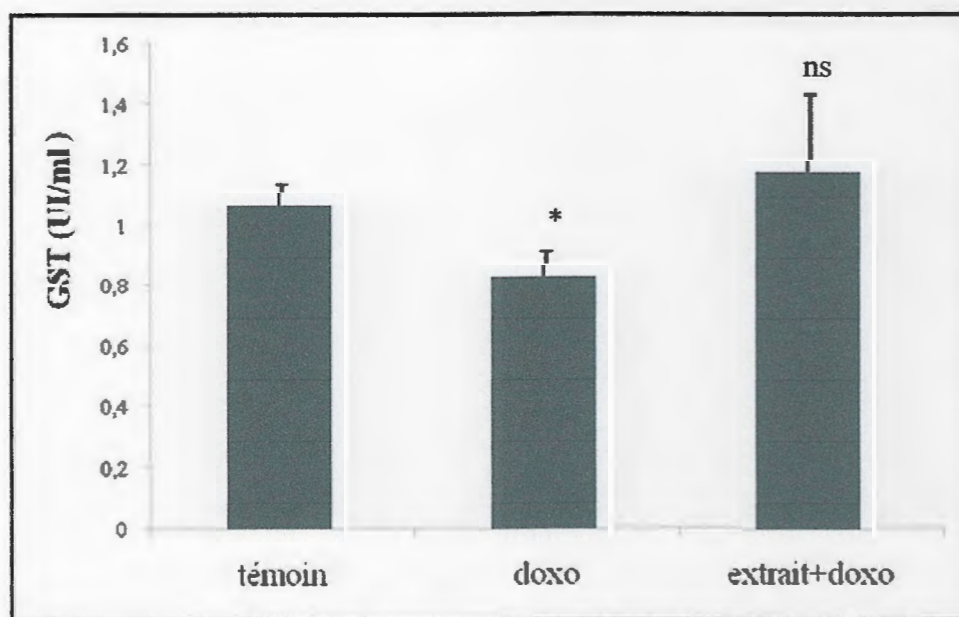


Figure 23b: Variation de l'activité enzymatique de la GST dans les reins après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

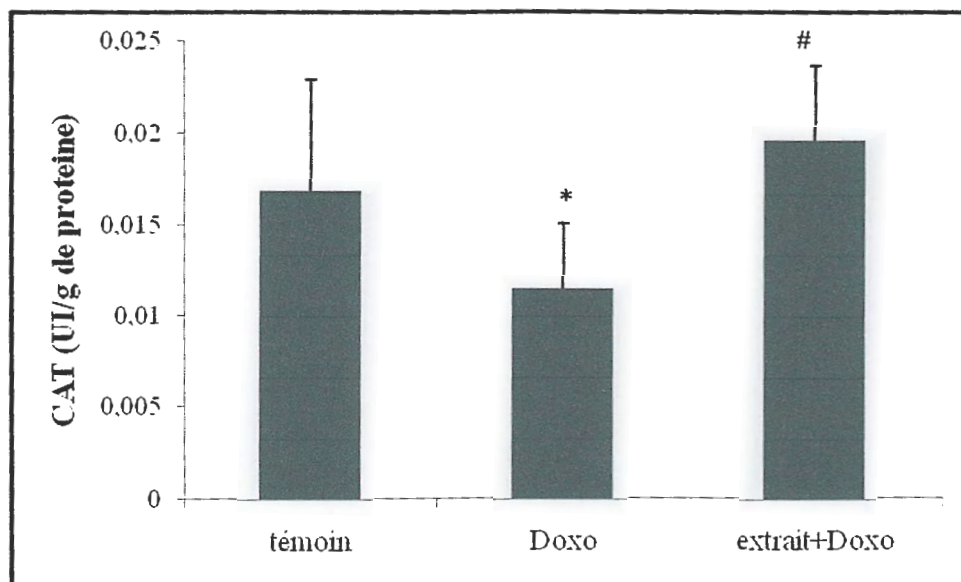


Figure 24a: Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le coeur après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

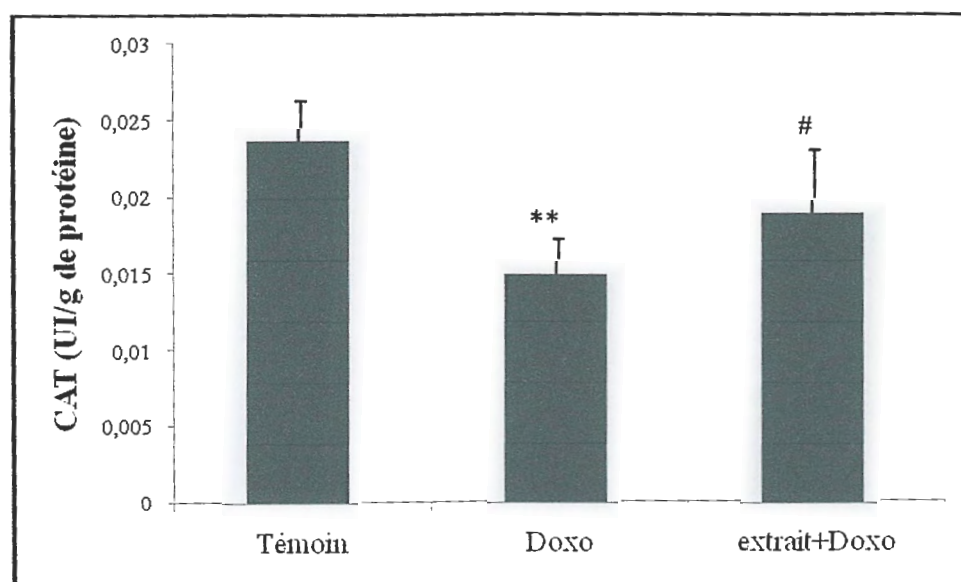


Figure 24b: Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans les reins après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

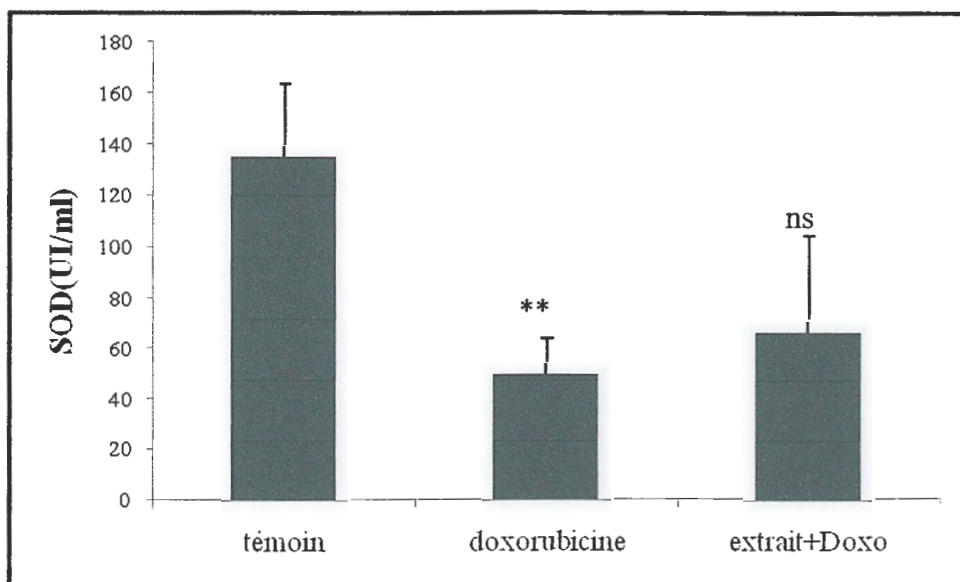


Figure 25a: Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le coeur après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

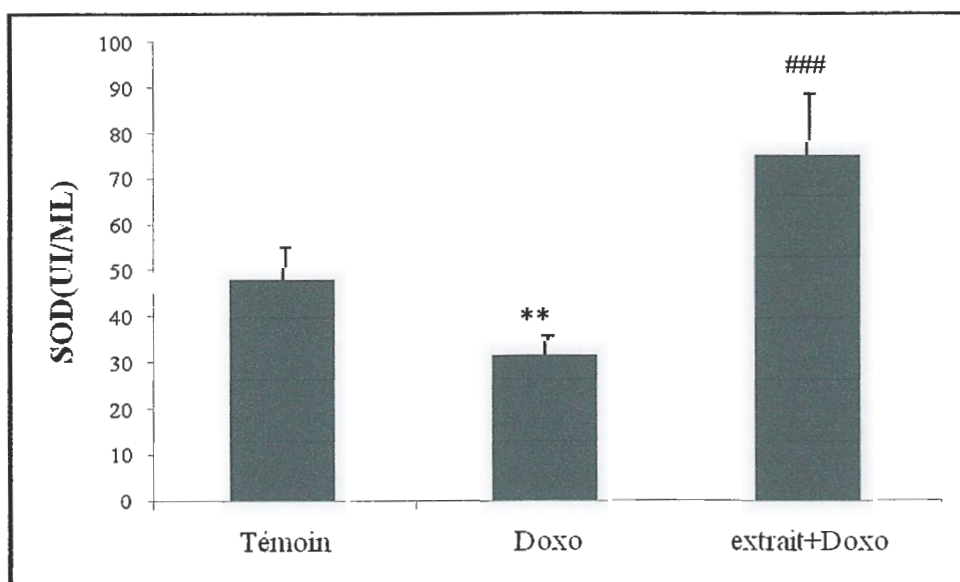


Figure 25b: Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans les reins après traitement par la doxorubicine 15 mg/kg seule ou associée avec l'extrait du *Thapsia garganica* 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

Chapitre 6

Discussion

Discussion

Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer les effets oxydants, sur le cœur et le rein, d'un traitement aigu par la doxorubicine et d'élucider le rôle éventuellement protecteur par l'administration IP d'un extrait brut de la plante *Thapsia garganica*.

La plante *Thapsia garganica* de la région de Jijel est utilisée localement par la médecine traditionnelle; raison pour laquelle nous avons procédé à l'extraction des polyphénols responsables de son éventuelle activité antioxydante. L'extraction des composés actifs est basée sur leur solubilité différentielle dans différents solvants organiques.

Dans la présente étude, l'extraction est réalisée à partir des racines et des éléments de la partie aérienne de la plante en utilisant l'éthanol comme solvant. Plusieurs phases ont été préparées suite à l'épuisement de l'extrait brut par différents solvants, et où un dosage des polyphénols fut réalisé afin de choisir la meilleure phase.

D'un point de vue qualitatif, les données expérimentales comparées aux données de la littérature, laisse penser que l'extrait aqueux renferme surtout les composés phénoliques les plus polaires (rendement le plus élevé), alors que l'extrait butanolique comporte les di et triglycosides, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle est riche en certains aglycones et les monoglycosides et enfin, l'extrait d'éther éthylique serait surtout riche en aglycones (**Kebieche, 2009**).

A la fin des affrontements, le recouvrement était de 85.87% pour les racines soit une perte de 14.13% de matière. La perte était plus importante pour la partie aérienne et où le recouvrement valait 58.82%. Ceci s'expliquerait par le nombre assez élevé de lavages effectués dans le protocole d'extraction, et qui pourrait conduire à des pertes substantielles de matière d'où les inconvénients de la méthode d'affrontement par les solvants (**Kebieche, 2009; Meziti, 2009**).

D'autre part, la macération est une méthode d'extraction discontinue *i.e.*, que le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée, ainsi il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement est relatif, il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. En outre, les conditions dans lesquelles la méthode d'extraction est réalisée affectent le contenu total en polyphénols et en flavonoïdes et par conséquent la capacité antioxydante, ce qui rend parfois difficile la comparaison de nos données avec ceux de la littérature (**Kechkar, 2008**).

Le dosage des polyphénols par la méthode de *Folin-Ciocalteu* au niveau des différentes phases obtenues à partir des racines et de la partie aérienne, montre que c'est cette dernière qui est plus riche en polyphénols que les racines, résultats attendus étant donné que les polyphénols sont responsables de la coloration des plantes (**Bruneton, 1999**). De plus des travaux menés sur d'autres plantes corroborent ce résultats (**N'gaman Kohué et al., 2009**).

La quantification des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) a permis de mettre en évidence une corrélation linéaire significative ($r^2 = 0.92$, $p \leq 0.05$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques; résultat logique vu que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols (**Meziti, 2009**). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie (**Stocker et al., 2004; Djeridane et al., 2006; Rached et al., 2010**), où on note une grande disparité entre les données, ceci semble être lié aux propriétés génétiques de la plante ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

L'activité anti-oxydante des différentes phases a été testée sur CCM avec du DPPH° (**Cuendet et al., 1997**) et par suivi de la cinétique de décoloration à 517nm du DPPH° (**Yingkun et al., 2002**). Les résultats confirment que les différentes parties de la plante présente une aptitude à piéger le DPPH° ce qui démontre que le potentiel antioxydant de la plante est avéré. Cependant, comparés à la vitamine C ($IC_{50} = 0.18 \text{ mg/ml}$) prise comme référence, les phases étudiées s'avèrent moins actives (Tableau 4). Par contre, en comparant les phases entre elles, on remarque que c'est l'acétate d'éthyle qui semble être plus active ($IC_{50} = 2.81 \text{ mg/ml}$); ceci serait dû probablement à la richesse de cette phase en composés phénoliques et en flavonoïdes (Tableau 3).

Comme l'on montré un grand nombre de travaux réalisés sur l'activité antiradicalaire des extraits de plantes (**Mansouri et al., 2005; Beta et al., 2005; Samaniego et al., 2007**), les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes (FLOH) sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les ROS. Cette propriété des flavonoïdes est attribuée à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres (R^\bullet) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO \bullet) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH); le FLO \bullet subira par la suite un réarrangement structurel permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyde (**Javanovic et al., 1994**).

L'étude *in vivo* de l'effet protecteur des extraits de la plante sur des rats fut réalisée en utilisant l'extrait brut obtenu après évaporation de la phase organique ayant donnée l'activité antiradicalaire la plus puissante, à savoir l'acétate d'éthyle.

Injection d'une dose aigue de la doxorubicine par voie intrapéritonéale à raison de 15mg/kg/j a induit une atteinte cardiaque et rénale après 24h du début du traitement. Ceci est peut être en rapport avec le rôle de filtration des reins (Loru et al., 2009) et le fait que la doxorubicine s'accumule préférentiellement au niveau du cœur (Goormaghtigh et al., 1990). Les données biochimiques confirment ces atteintes (figures 16, 17, 18, 19, 20).

D'une part, d'un point de vue physiologique, des lésions au niveau du rein (filtre glomérulaire et épithéliums tubulaires) entraînent une augmentation des concentrations de la créatinine et de l'urée plasmatique, ces dernières sont les marqueurs les plus mesurés pour évaluer la néphrotoxicité et l'efficacité du traitement (Mohan et al., 2010). Nous avons remarqué une augmentation significative des concentrations de la créatinine et de l'urée plasmatique ($p < 0.01$) chez les rats traités par la doxorubicine, résultat en accord avec la littérature (Boutabet, 2007; Lahouel et al., 2010) montrant que la l'injection de la doxorubicine à 10mg/kg chez les rats augmente de façon significative la créatinine plasmatique et conformant la néphrotoxicité de la doxorubicine. Par contre, après le prétraitement par l'extrait nous avons enregistré une diminution significative ($p < 0.01$) des concentrations de l'urée plasmatique chez les rats recevant l'extrait végétal ce qui indique que l'extrait à un effet protecteur contre les effets notoires de la doxorubicine sur la fonction rénale et cet effet peut être du aux composés phénoliques et surtout les flavonoïdes (Mohan et al., 2010).

D'autre part, pour évaluer l'atteinte cardiaque, la mesure des activités de certains enzymes dans le plasma, essentiellement la créatine kinase (CK) et les transaminases (TGO et TGP) ont été analysées car leur augmentation est un signe fiable en cas des dommages myocardiques (Petit, 2004).

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'activité plasmatique de la créatine kinase ($p < 0.001$) et des transaminases ($p < 0.01$) chez les rats traités par la doxorubicine par rapport aux rats témoins, ce qui confirme les effets délétères de la doxorubicine sur le cœur (Hou et al., 2009; Alyane, 2010). Toutefois, l'administration de l'extrait du *T. garganica* semble être sans effet contre l'effet délétère de la doxorubicine sur le cœur.

En dépit de la large utilisation de la doxorubicine dans le traitement des patients atteints de cancer, son mécanisme d'action n'est pas encore bien connu et a souvent été l'objet de controverses. Plusieurs mécanismes semblent prendre en compte les effets de cette anthracycline, à la fois en termes d'action anticancéreuse et de la toxicité cardiaque, rénale, et d'autres organes. Il est largement admis que le stress oxydatif et la production de radicaux libres sont impliqués dans l'action de la doxorubicine.

Notre étude montre que la doxorubicine a induit une augmentation significative de la peroxydation lipidique (TBARS) au niveau du cœur et des reins, qui apparaît 24h. Cette augmentation des TBARS confirme l'effet peroxydatif de la doxorubicine. De nombreux auteurs ont mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par la doxorubicine (**Gouttebel, et al., 1996; Hrelia et al., 2002; Alyane et al., 2008; Lahouel et al., 2010**).

Pour le cœur, sa sensibilité accrue à la doxorubicine est attribuée à son fort métabolisme oxydatif qui nécessite par conséquent de faibles taux de défenses antioxydantes (**Herman et al., 2000**). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Minotti (1990)** qui ont confirmé qu'une dose unique de la doxorubicine induit une toxicité chez les rats et augmente le taux de l'MDA dans le cœur.

D'autre part, plusieurs propositions concernant les mécanismes de la néphrotoxicité induite par la doxorubicine ont été mis en avant, impliquant le rôle des radicaux libres qui sont de plus en plus produits par la doxorubicine (**Nakano et Gemba, 1989**). En outre, les travaux de **Demian et al. (2001)** qui ont démontré que le traitement par la doxorubicine réduit de façon significative la capacité antioxydante dans le rein, expliquerait le résultat obtenu dans notre étude.

Le prétraitement par l'extrait végétal (10mg/kg pendant 6j) a réduit significativement l'effet peroxydatif de la doxorubicine au niveau du cœur et des reins par rapport à celle des rats traités par la doxorubicine seule. Cet effet antioxydant est certainement dû à la richesse de l'extrait végétal en polyphénols et flavonoïdes, qu'à leur capacité de piégeage des radicaux. Néanmoins, nos résultats montrent que notre extrait après 6j d'administration n'a pas rétabli le niveau basal des TBARS dans les tissus cardiaques et rénaux, étant donné que le taux de TBARS reste élevé dans ces organes par rapport aux rats témoins. Ceci suggère soit, une pauvreté en polyphénols de la plante, soit qualitativement les polyphénols de *Thapsia garganica* sont moins efficaces.

Les cellules possèdent des systèmes de défense antioxydants, tels que le glutathion (GSH) et les enzymes antioxydantes : catalase et superoxyde dismutase, qui permettent de réguler le niveau des ROS intracellulaire.

À la suite de l'injection intrapéritonéale de doxorubicine, nous avons mis en évidence une diminution significative au niveau du cœur et non significative au niveau du rein des taux tissulaires du GSH. Cette diminution est certainement en rapport avec la production de ROS induite par la doxorubicine (Venkatesan, 1998; Zhou et al., 2001; Koti et al., 2008). En effet, d'une part, le GSH intervient plus rapidement que d'autres agents antioxydants et qui piège directement les ROS (Aurousseau, 2002). D'autre part, le GSH est aussi un substrat clef pour les enzymes antioxydantes telles que les glutathion S-transférase (GST) qui neutralisent le peroxyde hydrogène, sa diminution peut être due à sa consommation accrue par ces enzymes (Desmots et al., 2002)

L'absence de différence significative dans le contenu rénal de GSH entre témoins et traités pourrait être due d'une part, à l'intervention compensatrice d'autres systèmes antioxydants en réponse à un stress oxydatif. D'autre part, l'augmentation de la consommation enzymatique et non enzymatique du GSH pour la détoxification des ROS générés par la doxorubicine, entraîne une élévation dans l'expression du gène codant pour l'enzyme γ -glutamyl-cystéine synthétase d'où une augmentation de l'activité de cet enzyme responsable de la restitution du taux cellulaire du GSH (Yin et al., 2000) d'où cette variation non significative de GSH.

Il importe de savoir que certains auteurs (Ibrahim et al., 2009) ont rapportés que la doxorubicine réduit significativement les réserves tissulaires du GSH. Administration de la doxorubicine peut avoir des effets différents sur les niveaux de GSH, selon l'espèce animale, l'organe étudié, la dose du médicament et la durée du traitement (Yilmaz et al., 2006).

Chez les rats prétraités, le taux de GSH au niveau du cœur et du rein était comparable à ceux des témoins, ce qui plaide en faveur du rôle protecteur de l'extrait. Cet effet démontre le pouvoir antiradicalaire des polyphénols en général. Ces molécules sont donc capables d'empêcher la chute du GSH et stimulent sa régénération à partir de GSSG (Martin, 2003) suite à la neutralisation des ROS par les flavonoïdes.

Nos travaux ont également montré que la doxorubicine inhibait l'activité de la catalase et de la SOD dans les cellules cardiaques et rénales. L'inhibition de ces activités enzymatiques pourrait être expliquée par la production excessive et l'accumulation de ROS ainsi que l'augmentation des TBARS observés (**Arafa et al., 2005; Koti et al., 2009**).

En association avec l'extrait végétal, la doxorubicine n'a pas induit une modification significative de l'activité de la catalase et de la SOD. Ceci suggère que les ROS générées au niveau des cellules cardiaques et rénales des rats traités par la doxorubicine étaient en quantité insuffisante pour induire l'activité de ces enzymes, et ceci du fait des capacités de piégeage des radicaux libres des composés phénoliques de l'extrait.

Conclusion
&
Perspectives

Conclusion

Actuellement le concept d'une thérapie à l'aide d'antioxydants, dans le but de renforcer les défenses antioxydantes endogènes, pour une protection plus efficace contre le stress oxydatif représente un but thérapeutique important.

En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours aux plantes médicinales douées d'activité antioxydante s'avère très avantageux et d'actualité.

Dans notre étude, les extraits du *Thapsia garganica* semblent présentés un intérêt réel et potentiel par leur activité antioxydante établi *in vitro* qu'*in vivo*. L'évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits contre le DPPH° *in vitro*, a permis de d'identifier l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante *T. garganica*, comme celui contenant le plus de composés anti-radicalaires.

Dans l'étude *in vivo*, nous nous sommes intéressés à analyser l'effet protecteur de l'extrait de la plante contre le stress oxydatif rénal et cardiaque induit par la doxorubicine. Les résultats obtenus montre que la plante *T. garganica* possède une activité antioxydante sur le tissu rénale et cardiaque à travers:

- ❖ La limitation des effets délétères de la doxorubicine et la protection des fonctions rénales et cardiaques, démontrées par la diminution du taux de l'urée et de la créatinine sérique.
- ❖ La protection des membranes cellulaire contre effet nocifs des ROS, par inhibition de la peroxydation lipidique.
- ❖ Le maintien du statut antioxydant enzymatique et non enzymatique cellulaire, noté par l'augmentation des activités de la SOD, CAT et GST et la stimulation de la synthèse du GSH.

Cependant, nos résultats préliminaires laisse penser que cette plante est peu efficace pour lutter ou minimiser les effets délétères d'un stress oxydatif, raison pour laquelle nous recommandons des travaux complémentaires afin de ratifier et de réfuter ces résultats à travers une analyse plus poussée :

- Poursuivre l'étude chimique de la plante *Thapsia garganica* afin d'identifier la nature et le nombre des flavonoïdes.
- Séparer chaque flavonoïde afin de mesurer l'activité antioxydante de chaque composé séparé.
- Faire des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs serait utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

Références

Bibliographique

Références bibliographiques

- Abraham SA**, Waterhouse DN, Mayer L D, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The liposomal formulation of doxorubicin. In: Nejat duzgunes ed. *Methods in Enzymology. Academic Press (2005)* 391: 71-97.
- Aebi H**. Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York (1974)* 2: 673-684.
- Ali H**, Brogger CS, Foreman JC, Pearce FL, Piotrowski W, Thastrup O. The ability of thapsigargin and thapsigarginin to activate cells involved in the inflammatory response. *Br. J. Pharmac (1985)* 85: 705-712.
- Alyane M**. Etude des mécanismes moléculaires de la toxicité cardiaque de la doxorubicine. Thèse de doctorat en toxicologie. Université de Jijel (2010): 85-90.
- Arafa HM**, Abd-Ellah MF, Hafez HF. Abatement by naringinin of doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst. 17 (2005)*: 291-300.
- Aurousseau B**. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Productions Animales (2002)* 15: 67-82.
- Avato P** et Rosato I. Essential Oils from the Roots of *Thapsia garganica* L. *Journal of Essential Oil Research (2002)*14(1): 20-22.
- Baba Aissa F**. Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. *Librairie moderne, ROUIBA EDAS (2000)* Algérie.
- × **Bahorun T**, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung (1996)* 46: 1086-1089.
- Balaban RS**, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell (2005)* 120: 483-495.
- Beauchamp C**, Fridovich I. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem (1971)* 44: 276-87.
- Beta T**, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry (2005)* 82: 390-393.
- Blaut M**, Schoefer L, Braune A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res (2003)* 73: 79-87.
- Bnouham M**, Merhfour FZ, Elachoui M, Legssyer A, Mekhfi H, Lamnaouer D, Ziyat A. Toxic effects of some medicinal plants used in Moroccan traditional medicine. *Moroccan J. Biol (2006)*: 21-30.
- × **Boizot N**, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra (2006)* :79-82.
- Borg JM**, Reeber A. Biochimie métabolique, *Ellipses, Paris (2008)* 257-269.

- Bouquet J.** Matière médicale indigène de l'Afrique du Nord, *Trav. Off. Nat. Matières Premières Végétales* (1921) 8 : 1-29.
- Boutabet K.** Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Thèse de Magistère de l'université de Jijel (2007).
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* (1976) 72 : 248-254.
- Bruneton J.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition, *Tec & Doc Lavoisier, Paris* (1999) : 310-353.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S.** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem* (2002) 6: 93.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL.** Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* (2003) 531: 5-23.
- Cauvet D.** Nouveaux éléments d'histoire naturelle médicale, Volume 2. Edition J.B. Bailliére & fils Paris (1869): 319-322
- Cazin FJ.** Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées avec un atlas de 200 plantes lithographiées. 4^{ème} édition revue et corrigée par H. Cazin. *Paris : P. Asselin,* (1876) : 1189
- Chaaya RY.** Rôle du stress oxydant induit par les monoamines oxydases dans la fibrose rénale : étude in vivo dans un modèle d'ischémie reperfusion chez le rat. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse (2010).
- Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE, Ryan DP, Ramachandra S, Richardson PG., Supko JG., Wilson WH.** Antineoplastic agents. In: Brunton L.L. ed. *The Pharmacological Basis of Therapeutics -11th Ed. série Goodman & Gilman's. The McGraw-Hill Companies* (2006).
- Chebil L.** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle; thèse de doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut national polytechnique de Lorraine (2006).
- Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, Wang Z, Wan SB, Lam WH, Chan TH, Dou QP.** Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci* (2004) 9: 2618-2631.
- Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP.** Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* (2001) 62: 1185-1191.
- Chira K, Suh JH, Saucier C, Teissèdre PL.** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* (2008) 6: 75-82.

Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)* (2006) 13: 24-29.

Claiborne A. Catalase activity. In: Greenwald RA (ed) CRC handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press, Boca Raton, FL* (1985) 4: 2834.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van-Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod* (1998) 61: 71-76.

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry* (2001) 1: 569-590.

Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta* (1997) 80: 1144-1152.

Da Silva SL, Da Silva A, Honório KM, Marangoni S, Toyama MH, Da Silva ABF. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* (2004) 684 : 1-7.

Daumas E, et Chancel A. Le Grand désert (Itinéraire d'une caravane du Sahara au pays des Nègres. *Edition Napoleon & Cie, Paris* (1848) : 387-390

Delemasure S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L. Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines : approche fondamentale des mécanismes mis en jeu ; relations avec les données cliniques. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (2006) 55: 104 -112.

Delporte C, Backhouse N, Erazo S, Negrete R, Vidal P, Silva X, López-Pérez JL, San Feliciano A, Muñoz O. Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* (2005) 99: 119-124.

Deman A, Ceysens B, Pauwels M, Zhang J, Houte KV, Verbeelen D, Van den Branden C, Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant* (2001) 16, 147-150.

Denmeade SR, Jakobsen CM, Janssen S, Khan SR, Garrett E. S., Lilja H., Christensen S. B., Isaacs JT. Prostate-Specific Antigen-Activated Thapsigargin Prodrug as Targeted Therapy for Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* (2003) 95: 13.

Desmots F, Rissel M, Pigeon C, Loyer P, Loréal O, Guillouzo A. Differential effects of iron overload on GST isoform expression in mouse liver and kidney and correlation between GSTA4 induction and overproduction of free radicles. *Free Radic Biol Med* (2002) 32(1):93-101.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* (1999) 65: 337-353.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* (2006) 97: 654-660.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* (2007) 224: 801–809.

Doreau M. Considérations actuelles sur l'alimentation, ainsi que sur la pharmacopée et la thérapeutique traditionnelles au Sahara. Thèse Faculté de Pharmacie Strasbourg. (1961) : 108.

Drew DP, Rasmussen SK, Avato P, Simonsen HT. A comparison of headspace solid-phase microextraction and classic hydrodistillation for the identification of volatile constituents from *Thapsia* spp. provides insights into guaianolide biosynthesis in Apiaceae. *Phytochem Anal.*, (2012) 23(1): 44-51.

Drog W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol.rev* (2002)82 : 47-95.

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharm Rev.* (1999) 51(4): 691-743.

Dušan M, Vesna K. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc* (2007) 72 (10) 921-939.

Ellingwood F. American Materia Medica, Therapeutics and Pharmacognosy (1919) p. 431.

Ellman GL. Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biophysics* (1959) 82: 70–7.

Favier A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* (2003) : 108-115.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* (1993) 341: 454-457.

Gaffiot F. Dictionnaire latin - français. *Hachette*, Pris (1934). p.1702.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique* (2003) 91-96.

Gattefosse J. Les plantes dans la thérapeutique indigène du Maroc, in *Sur les productions végétales du Maroc*. Rap-port de la mission PERROT-GENTIL. *Off. Nat. des Matières Premières Végétales* (1921): 73-123, Larose, Paris.

X **Georgé S**, Brat P, Alter P, Amiot JM. Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005) 53: 1370-1373.

Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (2005) 4: 162-169.

Gherraf N, Ladjel S, Zellagui A. Reinvestigation of essential oil content of *Thapsia garganica* grown in the east of Algeria. *Revue des sciences fondamentales et appliquées* (2011) 3 : 30-34.

Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2006) 41: 1220 - 1234.

- Goormaghtigh** E, Huart P, Praet M, Brasseur M, Ruysschaert JM. Structure of the adriamycincardioliipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem* (1999) 35:247-257.
- Gouttebel** MC, Zhang GH, Saingra B, Joyeux H. Rôle protecteur d'un apport oral de sélénium et de vitamine E vis-à-vis de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez le rat. *Nutr. Clin. Métabol* (1996) 10: 69-76.
- Greene** RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol : Implication for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer res* (1983) 43: 3417- 3421.
- Guichardant** M, Bacot S, Molière P, Lagarde M. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)* (2006) 13: 31-34.
- Habig** WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathion-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* (1974) 249: 7130-7139.
- Hand** R. Apiaceae. In: Euro+Med Plantbase-the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity (2011).
- Hande** KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1400: 173-184.
- Havsteen** B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* (2002) 96: 67 -202.
- Herman** EH, Zhang J, Chadwick, DP, Ferrans VJ, Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother. Pharmacol* (2000) 45, 329–334
- Hollman** PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed & Pharmacother* (1997) 51:305-310.
- Hollman** PCH, Katan MB. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* (1999) 37: 937-942.
- Horenstein** M, Silvana, Vander Heide Richard S, and L'Ecuyer Thomas J. Molecular Basis of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity and Its Prevention. *Molecular Genetics and Metabolism* (2000) 7: 436–444.
- Hortobágyi** GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs* (1997) 54: 1-7.
- Hou** XW, Jiang Y, Wang LF, Lin HM, Zhang S. Protective role of granulocyte colony-stimulating factor against adriamycin induced cardiac, renal and hepatic toxicities. *Toxicology Letters* (2009) 187: 40–44.
- Hrelia** S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, Hakim G. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002) 1567: 150-156.

- Ibrahim** MA, Ashour OM, Ibrahim YF, El-Bitar HI, Gomaa W, Abdl-Rahim SR. angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonist equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Pharm res*, (2009) 60 :373-381
- Iqbal** M, Som DS, Yasumasa O. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolising enzymes in male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol* (2003) 92: 33–8.
- Jäger** AK, Sehottländer B, Smitt UW, Nyman U. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Thapsia garganica*. *Plant Cell Reports* (1993) 12:517-520.
- Jun** X, Deji S, Ye L, Rui Z. Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. *International Journal of Pharmaceutics* (2011) 408: 97–101.
- Jung** K, Reszka R. Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Review* (2001) 49: 87 - 105.
- Kebièche** M, Lakroun Z, Mraïhi Z, Soulimani R. Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie* (2011) 9:274-282.
- Khacheba** I. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha-amylase. Mémoire en Génie Biologique. Université Amar Telidji. Laghouat (2008).
- Kechkar** M. Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire de Magistère en biotechnologies microbiennes. Université Mentouri. Constantine (2008).
- Kim** SR. Doxorubicin-induced reactive oxygen species géération and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Experimental and molecular medicine* (2006) 38 :535-545
- Kmoníčková** E, Melkusová P, Harmatha J, Vokáč K, Farghali H, Zidek Z. Inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase thapsigargin stimulates production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma. *European Journal of Pharmacology* (2008) 588: 85–92.
- Koechlin-Ramonatxo** C. Oxygen oxidative stress and antioxidant supplementation ,or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique* (2006) 20:165-177.
- Koti** BC, Vishwanathswamy AHM, Wagawade J, Thippeswamy AHM. Cardioprotective effect of lipistat against doxorubicin induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian Journal of Experimental Biolgy* (2009) 47: 41-46.
- Laguerre** M, López-giraldo LJ, Lecomte J, Pina M, Villeneuve P. Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* (2007) 14: 278-92.
- Lahouel** M, Boutabet K, Kebsa W, Alyane M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2010) 4(10): 712-720.

- Laughton** MJ, Evans PJ, Moroney MA., Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* (1991) 42(9):1673-81.
- Lavelle** F. Activité expérimentale de la THP-DOX. In: Jaquillat C., Weil M., Khayat D eds. Neo-Adjuvant Chemotherapy; Second International Congress. *INSERM/John Libbey Eurotext* (1988) 169: 803-806.
- Le Floc'h** E. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. *Imprimerie officielle de la République Tunisienne*, Tunis (1983) : 402.
- Lefèvre** G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torrelles J. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de biologie clinique* (1998) 56: 305-319.
- Licata** S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: Role of cytoplasmic deglycosidation and carbonylreduction. *Chemical Research in Toxicology* (2002) 13: 414-420.
- Linné** C. Mantissa plantarum. Generum édition VI. Et specierum édition II. Holmiae: Impensis Direct. Laurentii Salvii (1767): 742.
- Liu** H, Jensen KG, Tran LM, Chen M, Zhai L, Olsen CE, Søhoel H, Denmeade SR, Isaacs JT, Christensen SB. Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry* (2006) 67, 2651–2658.
- Liu** LL, Li QX, Li J, Shao L. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology* (2007) 231: 81-90.
- Loru** D, Incani A, Deiana M, Corona G, Atzeri A, Melis MP, Rosa A, Dessi MA. Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. *Toxicology and Industrial Health* (2009) 25: 301–310.
- Louis** A. Nomades d'hier et d'aujourd'hui dans le Sud tunisien. *Edisud Mondes méditerranéens*, France (1979) :334.
- Madi** A. Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de magister en Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine (2010).
- Makunga** NP, Jäger AK, Staden J. Micropropagation of *Thapsia garganica*: a medicinal plant. *Cell biology and morphogenesis* (2003) 21: 967-973.
- Makunga** NP, Jäger AK, Staden JV. An improved system for the in vitro regeneration of *Thapsia garganica* via direct organogenesis: influence of auxins and cytokinins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2005) 82: 271–280.
- Malisza** KL, Hasinoff BB. Inhibition of anthracycline semiquinone formation by ICRF- 187 (dexrazoxane) in cells. *Free Radical Biology & Medicine* (1996) 20 (7): 905-914.

Mansour A. Investigation phytochimique de l'extrait N-butanol de l'espèce *Centaurea africana*. Mémoire de magister en Chimie organique. Université de Constantine (2009).

Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* (2005) 89: 411-420.

Marcot I, Migeon C, Parache RM, Marchal S, Virion JM. Etude comparative de la quantification des récepteurs hormonaux dans les cancers du sein par immunocytochimie et biochimie. *Bulletin de cancer* (1997) 84(6): 613-18.

Martin F, Vannin I, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée, centre de l'immunologie de Marceille-Luminy NCERM U (2003) 102 : 17-19.

Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* (1995) 77: 147-161.

x **Meziti A.** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L, Étude *in vitro* et *in vivo*. Thèse de magister en biochimie appliquée, Université de Batna (2009).

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological reviews* (2000) 52:673–751.

Milane H. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur (2004) 13-36.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev* (2004) 56: 185-229.

Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore A. M, Mancuso C, Preziosi P, Cairo G. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium . *The FASEB Journal* (1998) 12: 541–552.

Minotti G. NADPH- and adriamycin-dependent microsomal release of iron and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys* (1990) 277, 268–276,

Mohan M, Kamble S, Gadhi P, Kasture S. Protective effect of solanum torvim on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Food and chemical toxicology* (2010) 48: 436-440

Mross K, Mayer V, Hamm K, Burk K, Hossefeld DK. Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans. *European journal of clinical pharmacology* (1990) 39 :507-513.

Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* (1998) 25: 10-14.

N'gaman Kohué CC, Békro YA, Mamyrbékova-Békro JA, Béné A, Gooré BS. Sur la Composition en Métabolites Secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits bruts de Gmelina

- Arborea Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research* (2009) 36 (2):161-171.
- Nakano S**, Gemba M, Potentiation of ci-induced lipid peroxidation in kidney cortical slices by glutathione depletion. *Jpn. J. Pharmacol.* (1989) 50, 87-92.
- Neuzil J**, Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters* (1993) 331: 281-284.
- Newman DJ**, Cragg GM. Plants as a source of anti-cancer agents, *Journal of Ethnopharmacology* (2005) 100, 72-79.
- Ohkawa H**, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochem* (1979) 95: 351-358.
- Orgogozo JM**, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Breteler MB. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol* (1997) 153(3): 185-92.
- Pacher P**, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev* (2006) 58, 87-114.
- Pein F**, Vassal G, Sakiroglu C, Tournade MF, Lemerle J. Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques* (1995) 2: 988-999.
- Pelzer LE**, Guardia T, Juarez AO, Guerreiro E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco* (1998) 53: 421-424.
- Picard M**. Etudes structurales et fonctionnelles de l'ATPase-Ca²⁺ du reticulum sarcoplasmique. Thèse de doctorat en biochimie et biophysique. Université Paris VI (2005).
- Pincemail J**, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO. Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme* (2002) 16: 233-239.
- Pincemail J**, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. *Medi Sphere* (MS) 95 (1999).
- Piotrowski WJ**, Marczak J. Cellular sources of oxidants in the lung. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* (2000) 13: 369-385.
- Potchoo Y**, Richard D, Sakiè E, Guissou IP, Kini F, Yaro B. Comparative phytochemical content of leaves extracts of tow *Annona senegalensis* pers: The one from Togo and the other originates from Burkina Faso. *Journal of biological sciences* (2008) 8 (3): 577-583.
- Pottier-Alapetite G**. Flore de la Tunisie. Volume 1. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et Ministère de l'Agriculture (1979) : 612.
- Rached W**, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of Biological Sciences* (2010) 10 (4): 316-324.

Reboulleau SD. Notice sur la résine de *Thapsia garganica* et sur son emploi en médecine comme agent révulsif sous forme d'emplâtre. Edition Abadie Constantine (1856):15

Rémésy C, Crespy V, Morand C, Besson C, Cotelte N, Vézin H, Demigné C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2003) 284(6): 980-988.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med* (2003) 20: 933-956.

Robert J. Anthracyclines. In : Cancer Clinical Pharmacology by: Shellens J.H.M., McLeod H.L., Newel D.R. eds. *Oxford University Press* (2005) 117-133.

Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney, A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (2006) 142: 317-327.

Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biology & Medicine* (2002) 33 (3): 409-422.

Roques J. Phytographie médicale : histoire des substances héroïques et des poisons, volume 2. Edition Cormon & Blanc, Paris (1835): 411.

Samaniego-Sánchez C, González A, García-Parrilla M, Granados J, Garcia de la Serrana Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine Pharmacotherapy* (2002) 56: 276-282.

Servais S. Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3. Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard- Lyon 1 (2004).

Shih PW, Lai PL, Jen H. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* (2006) 99: 775-783.

Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* (2004) 327: 649-662.

Soubeiran E. Traité de pharmacie théorique et pratique, Volume 2 , edition Victor Masson & fils, Paris (1870) pp :861.

Spetch PAJ, Van Hoesel Q, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin pharmacokinet* (1988) 15:15-31.

Stankovic MS, Topuzovic M, Solujic S, Mihailovic V. Antioxidant activity and concentration of phenols and flavonoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaerdyds* L. var. *glanduliferum* Haussk. *Journal of Medicinal Plants Research* (2010) 4(20): 2092-2098.

Stocker P, Yousfi M, Djerridane O, Perrier J, Amziani R, El Boustani S, Moulin A. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie* (2004) 86: 919-925.

Takanashi S, Bachur NR. Adriamycin metabolism in man. Evidence from urinary metabolites. *Drug metab dispos* (1976) 4: 79-87.

Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic macanimes to management. *Progress in Cardiovascular Diseases* (2007) 49: 330-352.

Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British Journal of Pharmacology* (1998) 124: 425-427.

Vergely C, Rochette L. Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie* (2003) 1: 131-9.

Vrignaud P, Londos- Gagliardi D, Robert J. Hépatie métabolism of doxorubicin in mice and rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* (1986) 11(2):101- 105.

Wainapel SF, Fast A. Alternative Medicine and Rehabilitation: A Guide for Practitioners. New York: Demos Medical Publishing (2003) 266-267.

Walle T. Absorption and metabolism of flavonoïds; *Free Radical Biology & Medicine* (2004) 36, 7: 829 – 837.

X **Waterhouse A.L.** Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2002): I1.1.1-I1.1.8.

Weil M. Historique des anthracyclines. In: Jaquillat C., Weil M., Khayat D eds. Neo-Adjuvent Chemotherapy; Second International Congress. *INSERM/John Libbey Eurotext* (1988) 169: 799-802.

Wilkinson PM, Mawer GE. The persistence of adriamycin in man and rat. *Br. J. clin. Pharmac* (1974) 1: 241-247.

Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D. Human metabolic pathways dietary flavonoïds and cinnamatates. *Biochemical Society Transactions* (2000) 28: 16-22.

Yao LH, JIANG YM., SHI J, Tomàs-Barberà FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* (2004) 59: 113–122.

Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*. (2006) 218:164-71.

Yin Z, Ivanov V, Habelhah H, Tew KD, Ronai Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against hydrogen peroxide-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res* (2000) 60:4053–7.

Yingkum Q, Yingjie C, Yupin P, Hisashi M, Masayuki Y. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia dillenii*: Structures of new co-pyrones and Flavonol glycoside. *Chem. Pharm. Bull* (2002) 50 (11): 1507-1510.

Zeghad N. Etude du contenu polyphénoliques de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister en Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine (2009).

Zhou Q, Chowbay B. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2002) 30: 1063-1074.

Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac Myocytes. *Toxicology Letters* (2001) 121: 151 - 157.

Annexes

Annexe 1**1. Tampon phosphate contenant KCl (1.17%) pour la préparation de la fraction cytosolique**

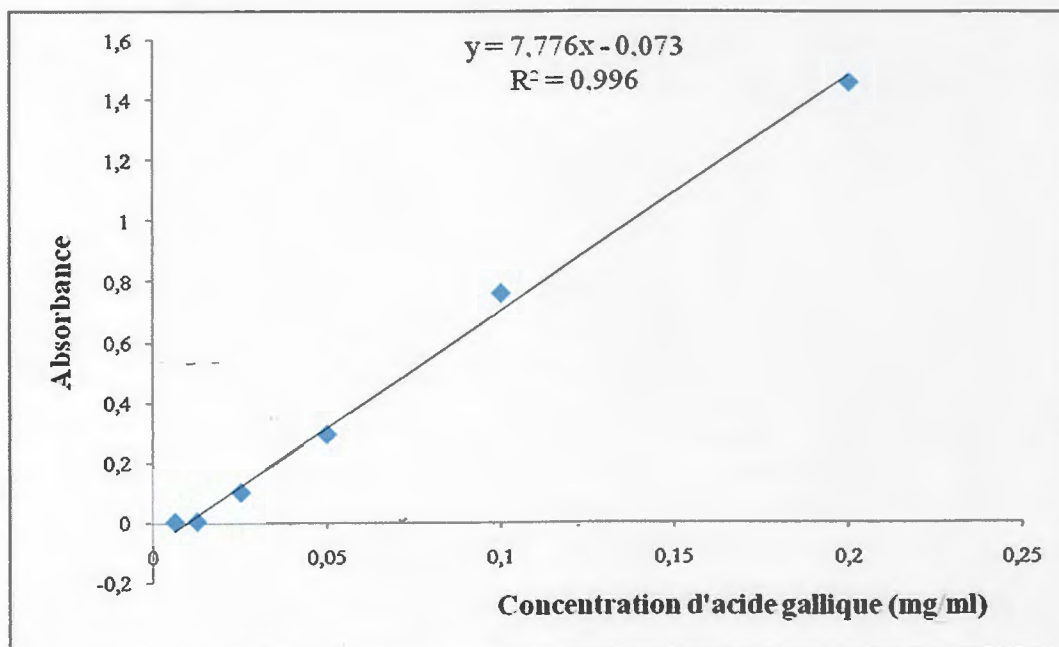
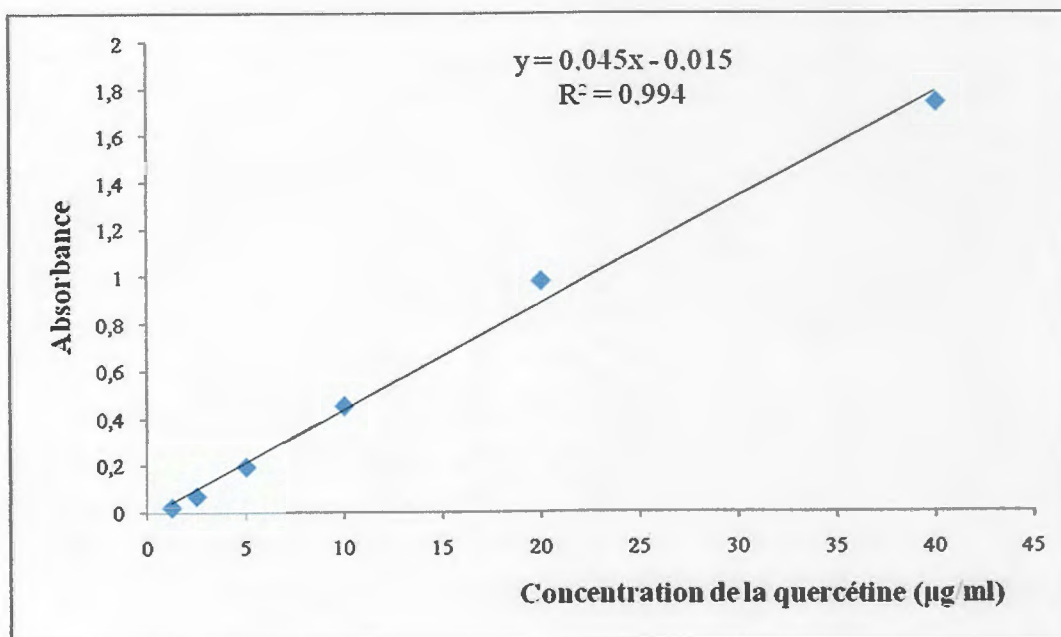
KH ₂ PO ₄ (0.1 M).....	1.36 g
Eau distillée.....	100 ml
KCl.....	1.17 g
pH 7.4	

2. Composition du milieu réactionnel pour le dosage de la SOD

Cyanide de sodium 10 ⁻² M.....	1 ml
Solution du NBT 1.76x10 ⁻⁴ M.....	0.1 ml
EDTA 66x10 ⁻³ M.....	1 ml
Riboflavine 2x10 ⁻⁶	0.1 ml
Tampon phosphate Na ₂ HPO ₄ (0.1 M).....	QSP 10 ml
pH 7.8	

3. Préparation du réactif de Bradford (BBC)

Bleu brillant de coomassie (BBC).....	10 mg
Ethanol (95 %).....	5 ml
Acide phosphorique (85 %).....	10 ml
Eau distillée.....	QSP 100 ml

Annexe 2**Figure 1:** courbe d'étalonnage des polyphénols (acide gallique comme standard)**Figure 2:** courbe d'étalonnage des flavonoïdes (la quercétine comme standard)

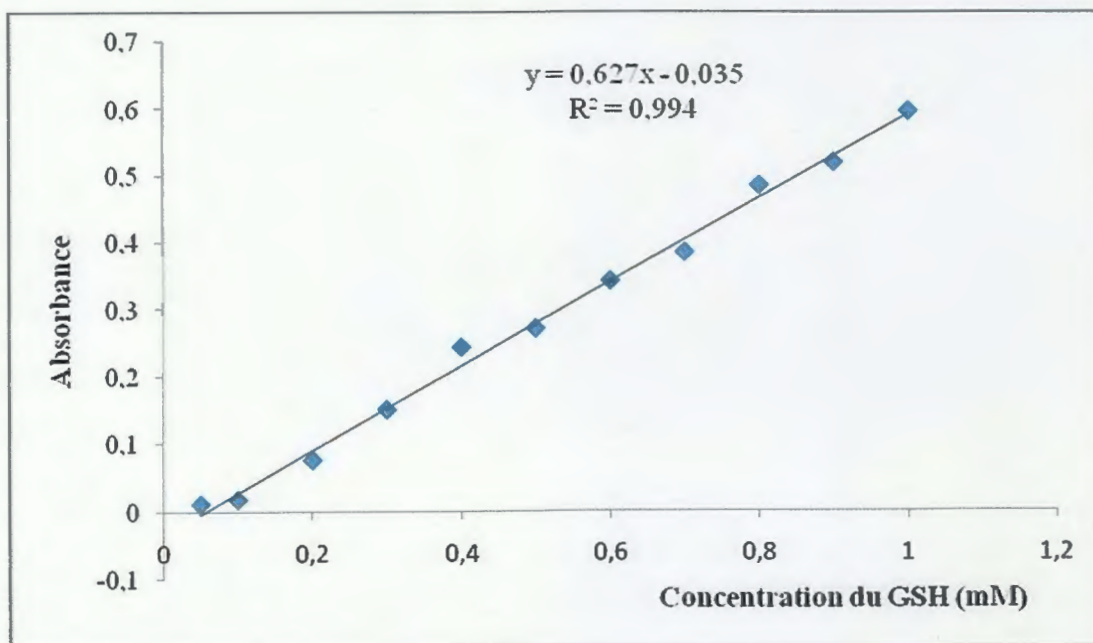


Figure 3: courbe d'étalonnage du glutathion (GSH comme standard)

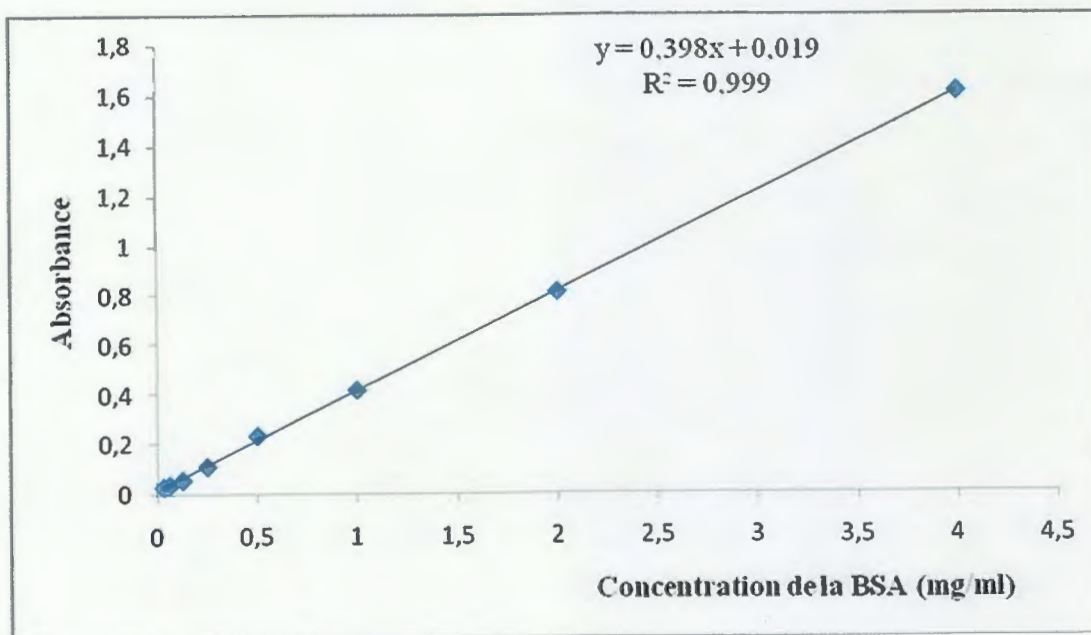


Figure 4: courbe d'étalonnage des protéines (l'albumine sérique bovine ou BSA comme standard)

Annexe 3**La vitamine C**

Concentration(mg/ml)	0,0475	0,095	0,19	0,39	0,78	1,56
% d'inhibition	44,98	48,65	52,31	53,54	54,15	55,49

L'extrait brut des racines

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25
% d'inhibition	14,17	15,64	17,72	52,56	55,74

L'extrait d'éther di-éthylique des racines

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
% d'inhibition	2,56	5,25	17,23	19,92	31,29	51.04

L'extrait d'acétate d'éthyle des racines

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
% d'inhibition	16,25	25	39,48	44,12	46,20	51.23

L'extrait *n*-butanol des racines

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
% d'inhibition	8,06	28,11	34,10	39,56	41,00	60.05

L'extrait aqueux des racines

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
% d'inhibition	19,80	26,64	32,76	35,20	42,53	55.03

L'extrait brut de la partie aérienne

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25
% d'inhibition	7,94	27,25	29,82	44,98	53,78

L'extrait d'éther diéthylique de la partie aérienne

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
% d'inhibition	3,30	32,76	35,93	39,72	49,87	58,56

L'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25
% d'inhibition	44,37	46,32	51,95	54,76	55,37

L'extrait *n*-butanol de la partie aérienne

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25
% d'inhibition	9,90	32,76	33,73	44,37	52,44

L'extrait aqueux de la partie aérienne

Concentration (mg/ml)	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
% d'inhibition	20,90	27,87	31,53	36,42	40,46	69,56

للتقليل من الآثار الثانوية للدوكسوروبيسين، و التي تحد من استعماله الطبية، تم اللجوء إلى عدة طرق مثل استعمال مركبات طبيعية مضادة للأكسدة. تندرج دراستنا الحالية ضمن هذا السياق، حيث تم استعمال نبتة *Thapsia garganica* كمصدر لمركبات فعالة ضد الاجهاد التاكسدي. تم استخلاص المركبات الفعالة، والتي تتمثل في المركبات الفينولية، من الجذور والجزء الهوائي للنبته. بعد التقدير الكمي للمركبات الفينولية، وتقييم نشاطها الازاحي للجذور الحرة تبين، كما كان متوقعا، أن الجزء الهوائي للنبته هو الأغنى بالمركبات الفينولية (21,97±0,45mg EAG/g extract) والأكثر فعالية في إزاحة الجذور الحرة (IC₅₀ = 2.81 mg/ml). كشفت الدراسة المجراة على الجرذان، بعد حقن المستخلص النباتي بجرعة 10 mg/kg/IP لمدة 06 أيام، التأثير الوقائي الجزئي ضد الاجهاد التاكسدي التجريبي على مستوى القلب و الكليتين، والنتائج عن حقن جرعة حادة من الدوكسوروبيسين (15mg/kg/IP). هذه الأخيرة تسببت في زيادة تركيز MDA في الكلى والقلب و زيادة هامة للكرباتينين و اليوريا البلازمية وأنشطة TGO، TGP و CK، وانخفاض في أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة الأنزيمية (SOD، CAT، GST)، وغير الأنزيمية (GSH). لكن المعالجة المسبقة خفضت هذه السمية من خلال تثبيط نسبي لأكسدة الدهون غير المشبعة (la peroxydation lipidique) و احتمال ترميم و/ أو حماية الأنظمة المضادة للأكسدة.

كلمات مفتاحية: *Thapsia garganica*، اجهاد تأكسدي، الدوكسوروبيسين، المركبات الفينولية، MDA، GSH.

Résumé

Pour minimiser des effets secondaires de la DOX, effets limitant son utilisation clinique, plusieurs approches ont été utilisées telles que l'emploi d'antioxydants naturels. C'est dans cette optique que le présent travail fut réalisé, en choisissant comme source d'antioxydants la plante *Thapsia garganica*. Après extraction de composés actifs à partir des racines et de la partie aérienne, le dosage des polyphénols totaux, et l'évaluation du pouvoir piègeur de ROS, ont révélés que c'est la partie aérienne de la plante qui semble plus active et plus riche en composés phénoliques, avec un taux de polyphénols de 21,97 ± 0,45 mg EAG/g extrait et une IC₅₀ de 2.81mg/ml. Etude in vivo, menée sur des rats de souche *Wistar*, a révélé l'éventuel effet préventif d'un traitement par un extrait brut à raison de 10 mg/kg/IP pendant 6j, sur les reins et le cœur après induction d'un stress oxydatif par une dose aiguë de la DOX (15mg/kg/IP). Cette dernière a provoqué une augmentation des concentrations du MDA dans les reins et le cœur, une augmentation significative de la créatinine et d'urée plasmatique ainsi que les activités des TGO, TGP et CK, et une diminution des systèmes de défenses antioxydants enzymatiques (SOD, CAT, GST), et non enzymatiques (GSH). Cependant, le prétraitement réduit cette toxicité à travers une relative inhibition de la peroxydation lipidique et l'éventuel restauration et/ou protection des systèmes antioxydants.

Mots clés: *Thapsia garganica*, stress oxydatif, DOX, polyphénols, MDA, GSH.

Abstract

To minimize the side effects of DOX that limiting its clinical use, several approaches have been used such as the use of natural antioxidants. In this context, the present work was carried out, using *Thapsia garganica* as a source of natural antioxidants. After extraction of active compounds from roots and from the aerial part, quantification of total polyphenols, and the evaluation of the scavenger effect have proved that the aerial part of the plant seems more active (IC₅₀= 2.81mg/ml) and more rich in phenolic compounds (21,97±0,45mg EAG/g extract) than roots. In vivo study, carried out on albinos rats, has revealed the possible preventive effect of treatment, by a crude extract of 10 mg/kg/IP during 6 days, on the kidneys and the heart, after induction of a oxidative stress by an acute dose of DOX (15 mg/kg/IP). The drug has caused an increase in the concentrations of MDA in the kidneys and the heart, a significant increase in both plasmatic creatinine and urea, as well as the activities of the TGO, TGP and CK, and a decrease in enzymatic (SOD, CAT, GST) and non-enzymatic (GHS) antioxidant defenses systems. However, the pretreatment of rats with plant extract reduce the nephro and cardiotoxicity of DOX through a relative inhibition of lipid peroxidation and the eventual restoration and/or protection of antioxidant systems.

Key words: *Thapsia garganica*, oxidative stress, doxorubicin, polyphenols, MDA, GSH.