



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Mariam El Adra HOUHOU –Nadia HASSINAT
Le : mercredi 10 juillet 2019

Evaluation de l'effet préventif d'un extrait aqueux d'Astragale sud Algérien contre la cardiotoxicité et hépatotoxicité induite par la doxorubicine chez les souris *Swiss albinos*

Jury :

Mme. Asma BOUCIF	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. Leila BELLEBCIR	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M Redouane REBAI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Nous voulons d'abord exprime nos profonds remerciements au bon DIEU qui nous adonné la volonté d'achever ce travail.

Nous voulons exprimé nos profonds remerciements a notre encadreur Madame, Bellebcir leila enseignant assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie l'université Mohamed Kheider de Biskra pour son attention, sasimplicité, sa sympathie et sa générosité scientifique. Qu'elle veille bien trouver icil'expression de toute notre gratitude pour son soutien permanant.

Nous voulons aussi remercie Madame Trabsa Hayat à la faculté des sciences de lanature et de la vie, Université Mohamed Kheider de Biskra pour son aide Nous voulons remercie tous les membres du laboratoire d'analyse de biochimie de l'hôpital Amor guergueb pour nous avoir permis de terminer les paramètre biochimique .

On remercie aussi tous les membres du laboratoire d'Anatom Pathologique de l'hôpital pour leur aide concernant la réalisation des coupes histologiques Nous avons remercie docteur Racha Mansert médecine du laboratoire d'Anatom Pathologique de l'hôpital Amor gargabe pour la lecture du coupe histologie.

On remercié vivement les membres de les équipes desingéneures et à leur tête Madame Saluha du laboratoire au département des sciences de la nature et de la vie

On remercie aussi tous les membres du personnel au Hakim saadan Biskra le pour leur aide, les pharmacies, docteurWafi donia et Ruina Lamia.

Nous tenons à présenter notre sincère remerciement aux membres de jury

Pour avoir accepté de juger notre travail.

Dédicaces

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce
travail que je dédie*

mes très chers parents : Ahmed et Khaira

A mes frères : Lakhdar et Abdalrahim

et mes sœurs : Aziza et soumia

A toute ma famille

A tous mes amies et collègues.

A toute personne qui lire ce travaille...

Nadia...

Dédicace :

Avant toute chose, je remercie Allah le miséricordieux.

Je dédie ce modeste travail à mes parents qui ont tout sacrifié pour mon bien, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère maman,

Mon cher papa,

Mon frères Belhadj et mes sœurs Nour, Aya, Chaima,

Mes grands parents maternels,

La mémoire de mes grands parents paternels,

Toute la famille Houhou,

A mes cousines : Wafa, Roumaissa,

Tous mes amis sans exception,

Tous ce qui me connaît.

Mariem

Liste des abréviations :

%: Pourcentage.

A: Absorption.

A .eremophilus: *Astragalus. Eremophilus*

BSA: Albumine bovine serum

BHT: Butylhydroxytoluene.

CPK: Créatinine Phosphokinas.

CS: Capillaires sanguins.

DNA: Desoxyribonucleic acid.

DOXO: Doxorubicine.

DTNB Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.

DS: Dystrophie musculaire.

EAAE: Extrait aqueux d'*Astragalus eremophilus*.

FMCI: Fibre musculaire cardiaque intacte.

g: Gramme

GPX: Glutathion peroxydase.

GSH: Glutathion.

H: hémorragie

HCL: L'acide chlorhydrique.

H&E: Hématoxyline et éosine.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

Kg: Kilogramme

LFMC: Lyse des fibres musculaires cardiaque

MDA: Malondialdehyde.

Mg: milligramme.

Min: minute

N: Noyau.

n mol: nano mole.

SOD: Superoxyde dismutase

SI: système immunitaire

TBA: Thiobarturic acid.

TC: Tissu conjonctif.

TCA: trichloroacetic.

TGO: Glutamic-axaloacetic transaminase.

TBS: Tris- buffered saline.

UV: Ultra-violet.

Sommaire

Titre	page
Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01
Partie 1	
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1	
l'espèce <i>Astragalus eremophilus</i>	
1. Les Astragales en Algérie	04
1.1 Description botanique de l'espèce <i>Astragalus eremophilus</i>	04
1.2 Systématique de la plante	05
1.3 Les composés chimique et biochimique des Astragales	05
1.4 Propriétés pharmacologiques et utilisation médicinale des espèces du genre <i>Astragalus</i>	05
2. La toxicité aigue	06
2.1. La détermination de la dose létale (DL₅₀)	06
2.2. Devenir d'un toxique dans l'organisme	06
2.3. Manifestation de la toxicité	06
2.3.1. L'absorption	07
2.3.2 La distribution	07
2.3.3 La biotransformation	07
2.3.4 L'excrétion	07
Chapitre 2 La toxicité induite par la doxorubicine	
1. La doxorubicine	09
1.1 Définition de la doxorubicine :	09
1.2 Mécanisme d'action de doxorubicine:	09
1.3 Effets secondaires majeurs de traitement à la doxorubicine:	10
1.3.1. Cardiotoxicité:	10

1.3.2. Hépatotoxicité Hépatotoxicité induite par la Doxorubicine :	10
2. Le stress oxydatif	11
2.1. Définition de stress oxydatif :	11
2.2. Les conséquences du stress oxydant	12
2.3. Les maladies liées au stress oxydant	12
2.4. Systèmes antioxydante non-enzymatiques	12
2.5. Systèmes antioxydants enzymatiques.	12
Partie 2 Expérimentale	
Chapitre 3 Matériels et méthodes	
1. Le matériel:	15
1.1 la plante: <i>Astragalus eremophilus</i>	15
1.2. Les animaux	15
2. Méthode	15
2. 1. Préparation de l'extrait aqueux :	15
2.2 Expérimentations animale	16
2.2.1 Les animaux et conditions d'hébergement:	16
2.3 Evaluation de toxicité aigue de l'extrait aqueux d'<i>Astragalus eremophilus</i>:	16
2.3.1 Détermination de DL₅₀	16
2.3.2. Observation des troubles symptomatiques	16
2.3.3 Traitement des animaux	16
2.3.3.1. Choix de la dose, des animaux et le médicament	16
2.4. Sacrifice des souris et prélèvement du sang et des organes	17
3. Méthode d'analyses biochimiques	17
3.1. Préparation des échantillons	18
3.1.1. Dosage du Créatinine phosphokinase (CPK):	18
3.1.2. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH)	18
3.1.3. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)	18
3.1.4. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)	19
4. Technique histologique	19
5. Stress Oxydatif	21
5.1. Préparation du tampon phosphate contenant du KCl	21
5.2. Préparation de la fraction cytosolique de tissus :	21
5.3. Dosage des protéines tissulaire	21
5.3.1 solution BSA	21
5.3.2. Préparation de réactif de Bradford pour dosage de protéine	22

5.4. Dosage des paramètres de stress oxydatif	22
5.4.1. Dosage des TBARS tissulaires	22
5.4.2. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx)	23
6. Analyse statistique des résultats	24
Chapitre 4 Résultats et discussions	
1.1. Rendement de l'extrait	27
1.2. Les paramètres toxicologiques	27
1.2.1. Détermination de DL₅₀	27
1.2.2. Les troubles symptomatiques observés :	27
1.2.3. Influence de la dose administrée sur les poids corporels des souris durant le test la toxicité	28
1.2.4. Influence du traitement sur les poids corporels des souris durant l'expérience	29
2. Influence du traitement sur les paramètres biochimiques	29
2.1. Influence du traitement sur créatinine phosphokinase (CPK)	30
2.2. Influence du traitement sur Lactate déshydrogénase (LDH)	31
2.3. Influence du traitement sur transférase (TGO)	32
2.4. Influence du traitement sur Glutamatooxatoacétate (TGP)	33
3. Influence du traitement sur le paramètre de stress oxydatif	34
3.1. Variation des concentrations en Malondialdéhyde : (MDA)	34
3.2. Variation des concentrations en Glutathion peroxydase (GPx)	37
4. Influence du traitement sur l'histologie	38
4.1. Etude histologique du coeur:	39
4.1.1. Les coupes histologiques du groupe témoin	39
4.1.2. Les coupes histologiques de groupe DOXO	40
4.1.3. Les coupes histologiques du groupe traité par l'extrait 100mg /k	41
4.1.4. Les coupes histologiques de groupe E 200	41
4.1.5. Les coupes histologiques du groupe E 100 +D	42
4.1.6. Les coupes histologiques de groupe E200 + D	42
4.2. Etude hépato-histologique	43
4.2.1. Les coupes histologiques de groupe témoin	43
4.2.2. Les coupes histologiques de groupe DOXO	44
4.2.3. Les coupes histologiques de groupe E100:	44
4.2.4. . Les coupes histologiques de groupe E 200	45
4.2.5. Les coupes histologiques de groupe E100 + D	45
4.2.6. Les coupes histologiques de groupe E200 + D :	46
Conclusion	48
Références bibliographiques	50
Annexes	
résumé	

Liste des figures

titre	page
Figure 1 : <i>Astragalus eremophilus</i>	04
Figure 1: <i>Astragalus eremophilus</i>	15
Figure 3: rendement d'extrait aqueux d' <i>Astragalus eremophilus</i>	27
Figure 4 :variation de poids corporelle des souris traité par l'extrait aqueux 2 g/kg	28
Figure 5 : variation de poids corporelle des souris traité par l'extrait aqueux 5g/kg	28
Figure 6 : variation du poids des souris durant la période expérimentale.	29
Figure 7 : Effet de l'extrait aqueux de plante <i>Astragalus eremophilus</i> (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique CPK chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)	30
Figure 8 : Effet de l'extrait aqueux de plante <i>Astragalus eremophilus</i> (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique LDH chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)	31
Figure 9 : Effet de l'extrait aqueux de plante <i>Astragalus eremophilus</i> (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique TGO chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)	31
Figure 10 : Effet de l'extrait aqueux de plante <i>Astragalus eremophilus</i> (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique TGP chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)	32
Figure 11 : variation de MDA (nmol/mg de protéine) dans le tissu cardiaque témoin et traité (D, E200, E200+D) après 10jour de traitement.	34
Figure 12 : Variation de taux de MDA(nmol /mg de protéine) dans tissu hépatique témoin et traités (D, E200,E200+D) apré 10jour de traitement	34
Figure 13 : variation du taux GPx (μmol de GSH / min /mg de protéine)dans le tissu cardiaque témoin et traité (D ,E200,E200+D) apré 10 jour.	35
Figure 14 : variation du GPx tissu hépatique (μmol GSH/min /mg de protéine) chez les souris témoins et traités (D, E200, E200+D) apré10 jour de traitement	36
Figure 15 : coupe histologique du tissu myocardique du groupe Témoin.	37
Figure 16 : la Coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par la Doxorubicine	38
Figure 17 : la coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait 100 mg /kg.	38
Figure 18 : la coupes histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait 200 mg/ kg.	39
Figure 19 : la Coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait <i>A. eremophilus</i> avec Doxorubicine (E100 + D	39
Figure 20 : la coupe histologique du tissu myocarde du groupe traité par l'extrait l' <i>A. Eremophilus</i> avec doxorubicine (E 200 + D).	40
Figure 21 : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe témoin	40
Figure 22 : la coupe histologique du tissu hépatique de groupe traité par Doxorubicine.	41

Figure 23 : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe traité par l'extrait 100 mg/kg.	42
Figure 24 : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe traite par l'extrait 200 mg /kg	42
Figure 25 : la coupe histologique de tissu hépatique du groupe traité par l'extrait 100 mg/kg avec la doxorubicine.	43
Figure 26 : la coupe histologique de foie du groupe traité par l'extrait 200 mg/kg avec doxorubicine	43

Liste des tableaux

Titre	page
Tableau 1 : la dose administré (2000 et 5000 mg /kg) par voie orale et la transformation en pourcentage du nombre de morts dans chaque lots.	27

Introduction

Introduction

Le cancer peut définir comme la croissance de nouveaux tissus dans notre corps et selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS en 2006), plus de 6 millions de gens meurent du cancer chaque année et ce nombre devrait augmenter de 50 %, d'ici 2020(Catherine Lauzon., 2008).

La chimiorésistance des cellules tumorales aux médicaments anticancéreux qui est fréquemment appelé résistance pléiotropique aux médicaments ou multi-drug résistance(MDR) représente le plus grand défi apporté à la chimiothérapie des cancers, cette résistance thérapeutique peut donc être définie par la diminution de la sensibilité des cellules tumorales et par conséquent la réduction de l'efficacité du traitement (Kara Ali. ,2016).

Doxorubicine est un antibiotique d'anthracycline glycoside qui possède un spectre anti tumoral efficace et larges activités contre une variété des tumeurs humaines solides telle que le cancer des poumons, utérins, aussi bien contre plusieurs autres types de cancer et malignités hématologiques (Sahna E et *al.* ,2003)Toutefois, son utilisation a été restreinte en chimiothérapie surtout en rai variée des toxicités y compris cardiaque, hépatique (Yilmaz S *et al.* ,2006).

La famille des Légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales. Un très bon exemple des Fabacées les astragales, leurs composition très riche en terme de nombreux éléments actifs, tels que les flavonoïdes, les polysaccharides, les glycosides triterpènes, les acides aminés et même des traces de minéraux. Astragalus contient également un flavonoïde nommé astragaline, qui est un puissant antioxydant (Saoudi M., 2008)

La prévention ou le contrôle du stress oxydant par un traitement antioxydant fait partie de la stratégie thérapeutique actuelle. Donc pour évite la toxicité de doxorubicine ,il faut administrez quelque agents supplémentaire comme les antioxydants qui inhiber directement la formation des radicaux libres, de la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ces espèces, en les piégeant pour former un compose stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion. La prévention ou le contrôle du stress oxydant par un traitement antioxydant fait partie de la stratégie thérapeutique actuelle (Kara Ali ., 2016)

Introduction générale

Le but de connaissance à cette plante n'a été jamais étudié pour évaluer ces vertus raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants:

L'évaluation *in vivo* de l'effet préventif de l'extrait d'*A. eremophilus* contre le stress oxydant induit par la doxorubicine chez des souris mâles *Wistar albinos* par :

- Dosage des paramètres biochimiques cardiaque et hépatique
- Détermination des paramètres de stress oxydant dans le tissu cardiaque et hépatique
- Etude histologique du cœur et du foie.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

**l'espèce *Astragalus*
*eremophilus***

1. Les Astragales en Algérie:

Les Fabacées sont une des plus importantes familles parmi les dicotylédones (BAZIZ, 2015) en Algérie, le genre *Astragalus* est assez bien représenté. En effet, la flore algérienne comporte 40 espèces d'*Astragales* (Quéze et Santa, 1962). L'*Astragalus* est divisé en trois séries appartenant à deux groupes A et B, selon l'épaisseur de la gousse. (Ozonda, 2004).

La plupart des *Astragales* ne sont pas toxiques, les espèces toxiques de ce genre sont classées selon la nature de la toxine dominante et le type d'intoxication qu'elles provoquent (Chouana., 2017).

1.1. Description botanique de l'espèce *Astragalus eremophilus*:

Calice tubuleux en cloche, à 5 dents subégales ou très inégales. Pétales généralement longuement onguiculés. Etendard dressé. Carène égalant environ les ailes. Etamines diadelphes, à gaine fendue au sommet. Ovaire pluri-ovulé à ovules sur 2 rangs. Gousse de forme variée, rarement uniloculaire, généralement à 2 loges plus ou moins complètes par introflexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente. Feuilles imparipennées en général, stipulées gousse lisse sur les bords du sillon. (Quéze et Santa, 1962).

Fleur petite, inférieure à 10 mm, gousse à bec court, stigmate prolongé en poils lui donnant un aspect barbu, fleurs blanches panachées de violet. Il est une plante velue, cendrée - Ça et là au Sahara sept; plus commun au Sahara centrale. sah. sind (Ozonda, 2004).

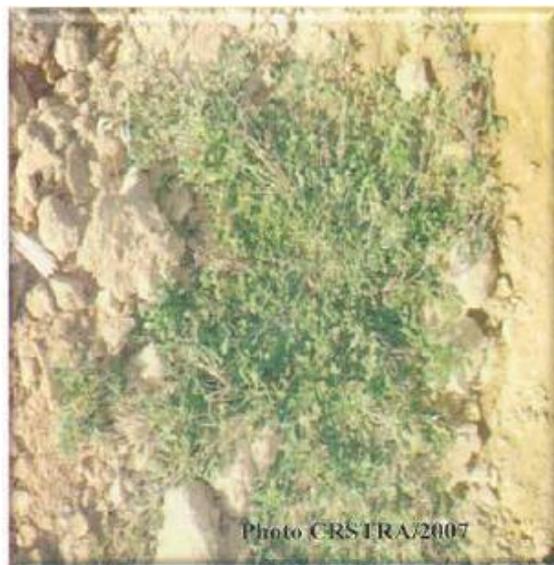


Figure 1: *Astragalus eremophilus* (la flore spontanée de la plaine d'el-outaya (ZIBAN), 2013).

1.2.Systématique de la plante:

Règne : Plantae

Sous-règne :Tracheobionta

Division :Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Famille: Fabaceae

Genre: Astragalus

Espèce: *Astragalus eremophilus* (botanica, 2013).

1.3.La composition chimique et biochimique des astragales:

Les travaux phytochimique effectués sur le genre *Astragalus* ont permis essentiellement l'isolement de saponines notamment de squelette cycloartane et oléanane, des composés phénoliques surtout les flavonoïdes et les isoflavonoïdes.

Les polysaccharides sont aussi abondants dans ce genre,tandis que les composants toxiques consistent en nitro-toxines, des alcaloïdes indolizidiques et des dérivées de sélénium (LABED A, 2016).

1.4.Propriétés pharmacologiques et utilisation médicinale des espèces du genre *Astragalus*:

En médecine traditionnelle chinoise, l'*Astragale* est considérée comme l'une des herbes les plus importantes pour le traitement des néphrites, du diabète, du cancer.

En outre, il est fréquemment utilisé comme aide culinaire (soupes, thés). Les études d'extraits de différentes espèces d'*Astragalus* ont montré une large variété d'activités biologiques permettant de les qualifier d'agents antioxydant, diurétique, antidiabétique, hépatoprotecteur, neuroprotecteur, analgésique, un immunomodulateur, expectorant et protecteur du tractus gastro-intestinal (institut Européen des substances végétales) Certains extraits d'*Astragalus* ont également été antihypertenseurs et anti-inflammatoires. Un groupe diversifié de composés pharmacologiques a été isolé des racines, des feuilles, des gousses et des graines d'*Astragalus* (BAZIZ, 2015)

Les plantes du genre *Astragalus* sont utilisées depuis des millénaires par les Hindous et les Chinois. En Inde, la pâte de feuilles est utilisée pour réduire le taux de sucre dans le sang,

alors que les racines sont mâchées par les femmes pour stimuler la lactation (CHOUANA T, 2017).

2. La toxicité aiguë: La toxicité aiguë d'une substance chimique est estimée par une série de tests réalisés sur des animaux de laboratoire (Benzidane, 2012). L'effet toxique aiguë est généralement considéré comme un effet qui se produit immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition (Segueni et Dridi, 2015).

L'étude de la toxicité aiguë est aussi qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après l'administration de la substance active (Boussahl , 2011). Le terme toxicité orale aiguë est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité DL_{50} (Yahiaoui et Otmani, 2016).

2.1. La détermination de la dose létale (DL_{50}):

La dose létale (DL_{50}) par voie orale: dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL_{50} est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg). (Ligne directrice de l'ocde pour les essais de produits chimiques, 2001) .

2.2. Devenir d'un toxique dans l'organisme:

Une substance qui pénètre dans l'organisme peut avoir des effets bénéfiques (médicaments) ou néfastes (toxiques). La réponse de l'organisme à un toxique dépend de la quantité de la substance présente dans un tissu ou un organe (Segueni et Dridi, 2015)

Les toxiques ne produisent pas des effets avec la même intensité sur tous les organes.

Des organes tels que le rein et le foie sont bien approvisionnés avec le sang et sont métaboliquement actifs, Ces organes sont appelés organes cibles puisqu'ils sont plus vulnérables et plus exposés aux toxiques que les organes ou les tissus mal irrigués (Segueni et Dridi, 2015).

2.3. Manifestation de la toxicité :

L'effet d'un toxique sur l'organisme dépend essentiellement de la quantité du toxique ou des substances réactionnelles qu'il engendre (métabolites actifs, radicaux libres) qui se fixe au niveau du site d'action (Boussahl , 2011).

2.3.1. L'absorption: La voie d'exposition (cutanée, digestive, pulmonaire, parentérale) exerce une influence déterminante sur la fraction de la dose "externe" qui pénètre dans la circulation systémique et ainsi atteint l'organe cible.

2.3.2. La distribution: Entre le moment où elle est absorbée et le moment où elle est excrétée, une substance chimique peut se distribuer dans divers tissus de l'organisme et subir de nombreuses transformations métaboliques.

2.3.3. La biotransformation: Dans l'organisme, la majorité des substances étrangères subissent des transformations métaboliques. La majorité des transformations métaboliques donnent naissance à des composés aisément excrétables par les voies urinaires et biliaires.

2.3.4. L'excrétion: Les voies urinaires et biliaires représentent les principales voies d'excrétion des substances étrangères. L'importance relative des deux voies principales d'élimination est intimement liée aux transformations métaboliques.

Chapitre 2

La toxicité induite par la doxorubicine

1. La doxorubicine :

La chimiothérapie consiste en l'administration de molécules anticancéreuses afin d'éliminer les tumeurs invasives qui ont tendance à se propager dans l'ensemble des tissus, pour former des métastases (Carange, 2010).

1.1 Définition de la doxorubicine :

La doxorubicine chlorhydrate est un médicament anticancéreux de la famille des anthracycline. Produite tout naturellement par des actinobactéries de genre *Streptomyces*, elle a été isolée pour la première fois en 1960 et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974. Depuis, c'est le meilleur antinéoplasique connu et le plus utilisé, entre autres dans le traitement de cancers tels que les leucémies et les tumeurs solides. Son administration se fait par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée. Les demi-vies de la doxorubicine sont: de 8 à 25 minutes, de 1h30 à 10h et de 24h à 48h. La présence de la deuxième phase de demi-vie serait due au métabolisme du médicament au niveau du foie, en doxorubicinol, et la troisième phase serait attribuable au relâchement du médicament des sites de liaison dans les tissus. La doxorubicine ainsi que ses métabolites seraient excrétés majoritairement par la bile. Cependant, 5% serait excrété par les voies urinaires ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine, soit la couleur de ce médicament, quelques jours après le traitement (LAUZON, 2008).

1.2 Mécanisme d'action de doxorubicine:

La doxorubicine agirait sur les cellules selon plusieurs modes d'action. Tout d'abord, près de 99.8% de son accumulation se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN, lui permettrait de s'insérer entre deux paires de bases azotées C-G à côté 5' à la suite de la formation de liaisons hydrogène spécifiques entre la doxorubicine et la guanine; donc modifiant la structure de l'ADN. Cette modification inhiberait l'action de la topoisomérase II, qui est un enzyme nucléaire chargée de modifier l'ADN lors de la transcription, la réplication et la mitose. La stabilisation de l'enzyme par l'intercalation de la doxorubicine causerait l'arrêt du cycle cellulaire par activation de « check points », responsables d'activer la réparation de l'ADN ou si les dommages sont trop importants, d'activer la mort de la cellule par apoptose. Finalement, les composés de dégradation de la doxorubicine entraîneraient la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-) le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyl (OH). Ces radicaux

libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (LAUZON, 2008).

1.3 Effets secondaires majeurs de traitement à la doxorubicine:

Le traitement de chimiothérapie implique l'usage d'agents toxiques dans le but de tuer les cellules tumorales. Cependant, dans certains cas, le traitement peut aussi affecter les cellules saines comme myocarde et hépatocyte (Carange, 2010).

1.3.1. Cardiotoxicité:

Le traitement de chimiothérapie implique l'usage d'agents toxiques dans le but de tuer les cellules tumorales. Cependant, dans certains cas, le traitement peut aussi affecter les cellules saines. Par exemple, la cardiotoxicité est un des désavantages majeurs de l'utilisation de la doxorubicine comme agent anticancéreux. En effet, ce médicament anticancéreux, 13 administré à des doses totales cumulées de 550 mg/m² entraînerait des problèmes cardiaques chez plus de 7 % des patients traités. Le mécanisme impliqué reste irrésolu, mais certains groupes de recherches ont observé une diminution de GATA-4, un facteur de transcription cardiaque important dans la différenciation lors du développement et essentiel à la survie, et de son ARNm ce qui induirait l'apoptose des cardiomyocytes (LAUZON, 2008).

La formation de radicaux libres est déterminante pour expliquer la toxicité cardiaque, et moins la cytotoxicité anti tumorale. Elle aboutit à la peroxydation des lipides des membranes mitochondriales et du réticulum sarcoplasmique par liaison avec le diphosphatidyl-glycérol. Les cellules myocardiques sont très riches en mitochondries et très pauvres en enzymes protectrices des radicaux libres comme la catalase ou la superoxyde dismutase. Enfin, sur le plan métabolique, la doxorubicine subit un processus d'oxydoréduction par une C13 aldocétoréductase, présente dans le coeur, mais absente du plasma, qui transforme la doxorubicine en doxorubicinol, métabolite moins actif que la molécule-mère sur le plan tumoral mais plus toxique sur le coeur par son action sur la pompe à calcium du sarcoplasme. (Mazevet, 2016).

1.3.2. Hépatotoxicité:

Hépatotoxicité induite par la Doxorubicine:

La doxorubicine, est un agent important qui a un large spectre contre les tumeurs humaines. Cependant, son utilisation dans la chimiothérapie du cancer est limitée à cause de son toxicité. Sa structure chimique de base quinone, son métabolisme hépatique, ainsi son mécanisme

d'action induisent la formation des radicaux libre qui sont à l'origine de l'hépatotoxicité induite par ce médicament. L'induction du stress oxydatif causé par la génération des radicaux libre, provoque un déséquilibre aux niveaux des enzymes antioxydant endogènes : Il a été mentionné que La Doxorubicine cause une augmentation des niveaux du superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPx) decobayes (Zatout,2015).

2. Le stress oxydatif:

2.1. Définition de stress oxydatif:

Le stress oxydant est défini comme un débalancement entre la production d'oxydants, ou ERO, et les molécules antioxydants en faveur des oxydants. Le terme ERO fait référence à plusieurs types de métabolites réactifs à l'oxygène tels que les radicaux libres et d'autres non-radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives possède un ou plusieurs électrons non appariés tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radicale hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'oxygène singlet $l'O_2$. Ces molécules se lient rapidement aux molécules non radicalaires à proximité résultant généralement en la formation de nouveaux radicaux. (Baratli, 2016).

Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques (acides gras, Caroténoïdes, polyphénols...) sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire et présentent trois phases:

Une phase **d'initiation** qui peut être due à l'intervention d'un radical hydroxyle HO qui arrache un atome d'hydrogène en position l'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que par les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni...).

Une phase de **propagation** : en présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde (ROO^{\cdot}) qui déstabilise une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturés AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique ($ROOH$) et à un nouveau radical. Une phase de **terminaison**, où se recombinent différents radicaux formés pour aboutir à des composés stables. Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox à lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres (Favier, 2003)

2.2. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Favier, 2003).

La rupture d'équilibre entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'ERO peut causer des dommages cellulaires importants pouvant aller jusqu'à provoquer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Carange, 2010).

2.3. Les maladies liées au stress oxydant:

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré (Favier, 2003). Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

2.4. Systèmes antioxydants non-enzymatiques:

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont passynthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (Blandine, 2006). Différents composés antioxydants non-enzymatiques sont apportés via l'alimentation, tels que les vitamines E (tocophérol) et C (acide L-ascorbique), les caroténoïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (Carenga, 2010).

2.5. Systèmes antioxydants enzymatiques.:

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Blandine, 2006), dont le rôle est d'éliminer les $O_2^{\cdot-}$ par une réaction de dismutation qui produit une molécule d'oxygène et une molécule de H_2O_2 à partir de deux $O_2^{\cdot-}$ (Carenga, 2010).

Partie 2

Expérimentale

Chapitre 3

Matériels et méthodes

1. Le matériel:

1.1 la plante: *Astragalus eremophilus*

Cette espèce est récoltée en début d'avril, dans les régions Elchoucha (Biskra, Algérie). Pour notre étude nous avons utilisé la partie aérienne (tige, feuille, gousse, graine).



Figure 1: *Astragalus eremophilus*

- **Matériel et réactifs (voir l'annexe).**

1.2. Les animaux : Nous avons utilisé dans le cadre de cette étude des souris mâles, 48 souris souche *Swiss albino*, Agé (2,5-3 mois), pesant entre 24 à 32 g (au début de l'expérimentation) qui a provenant de l'institut Pasteur d'Alger.

2. Méthode :

2.1. Préparation de l'extrait aqueux:

La partie aérienne de cette plante a été séchée à l'air libre, à l'ombre, à la température ambiante, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre. Al'aide d'un agitateur magnétique agité 50 g de cette poudre ont été macérés dans 700 ml d'eau distillée pendant 24 heures. Le macéré a été ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre (papier Whatman). Le filtrat est concentré à l'aide d'un rota vapeur à température 50 C° puis sécher par lyophilisateur.

2.2 Expérimentations animale:

2.2.1 Les animaux et conditions d'hébergement:

Après période d'adaptation dans le département de Biologie -Biskra- les animaux sont soumis à des conditions de contrôle de la température entre $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Et d'éclairage d'équivalence de lumière et obscurité 12 heures/12 heures, les souris sont hébergés dans des cages en plastique transparentes. 5 souris a un poids corporel varie 24-25 g choisie pour le teste de la toxicité en trois lots et regroupée les 48 souris à 6 cages (6groupes), en a dans chaque cage représente 8 souris.

2.3 Evaluation de toxicité aigue de l'extrait aqueux d'*Astragalus eremophilus*:

2.3.1 Détermination de DL₅₀ :

Cette expérimentation sur la toxicité aigue à été conduite pour déterminer les paramètres toxicologiques de la DL₅₀. Deux groupes de cinq souris sont mis à l'essai l'administration d'EAAE par voie orale l'aide de la sonde gastrique. 1^{er} groupe essay la dose limite de (2 000 mg/kg) et 2^{eme} groupe essay la dose principale (5 000 mg/kg) selon le protocole OCDE.

2.3.2. Observation des troubles symptomatiques :

Après l'administration de l'extrait, les animaux sont placés dans leurs cages .Ils doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 4heures dans les 24 heures qui suivent le traitement. Une attention particulière s'impose pendant les 14 jours quotidiennement. Pendant cette période ont été notés tous les troubles symptomatiques et changement du poid corporelle chez les souris des lots constitués.

2.3.3 Traitement des animaux :

2.3.3.1. Choix de la dose, des animaux et le médicament:

La plupart des études entreprises en toxicologie s'effectuent à la suite de l'administration de la dose par voie orale. Cependant d'autres voies d'administration sont possibles : intra péritonéale. D'après le test expérimental de DL₅₀, les souris males paraissent plus sensibles que les souris femelles, cette sensibilité liée au sexe pourrait être due aux différences physiologiques. Pour notre étude nous choisissons les doses 1/5 pour la toxicité aiguë. Les doses choisis sont (1/10 et 1/20) pour la concentration 2g/Kg Pc.

le médicament choisis est de classe antibiotique cytotoxique (anticancéreux), la doxorubicine qu'ont été fourni gracieusement par le service d'oncologie et de la chimiothérapie de l'hôpital El hakim SAADANE Biskra.

- Concentration de ce médicament 2mg /kg.
- La masse molaire: 543.519g /mol
- Concentration dans la cellule : 0.000147mol/l

-Les groupes traités:

Groupe 1: groupe témoin, souris recevant de l'eau distillée (groupe de contrôle).

Groupe 2: souris traitées avec l'extrait d'*Astragalus eremophilus* à 100mg/kg par gavage quotidiennement durant 10 jours.

Group 3: souris traitées avec l'extrait d'*Astragalus eremophilus* à 200mg/kg par gavage quotidiennement durant 10 jours

Groupe 4: traiter par la doxorubicine les souris ont injecté par (voie intra-péritonéale) dans les trois derniers jour à une dose de 15mg/kg.

Groupe5: souris traitées avec l'extrait d'*Astragalus eremophilus* à 100mg/ kg par gavage quotidiennement durant 10 jour l'administration de la doxorubicine (injection intra-péritonéale) dans les trois derniers jours 15mg/kg.

Groupe 6: souris traitées avec l'extrait d'*Astragalus eremophilus* à 200mg/ kg par gavage quotidiennement durant 10 jour et l'administration de la doxorubicine (par injection intra-péritonéale) dans les trois derniers jours a 15mg/kg.

2.4. Sacrifice des souris et prélèvement du sang et des organes:

Après 2heursde la jeune, les souris sont sacrifiés par décapitation Au moment du sacrifiés ont collecté le sang sur les tubes secs pour déterminé les paramètres biochimique apré centrifugation à 3000tours/munites pendant 15munites.

Le sérum récupéré et conservés à (-20 C°). Puis la dissection les souris nous sont prélèves le cœur et le foie, le rat et il sont pesés puis un membre des organes récupérés dans des flacons contient le formol pour faire l'étude histologique et conservé à température ambiant et les autres organes récupéré dans un papier aluminium pour fair le stress oxydatif conservé à température (-20C°) .

3. Méthode d'analyses biochimiques:

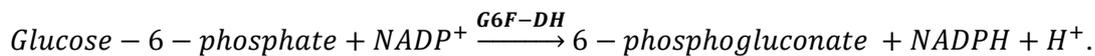
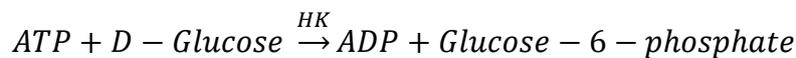
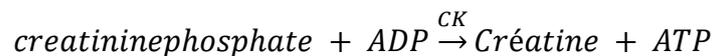
les paramètre biochimique étudiées sont: la créatinine phosphokinase (CPK), Lactate déshydrogénase (LDH), les transaminases: transférase (TGO) et Glutamatooxatoacétate (TGP) au niveau du laboratoire d'analyse médicale service gynécologie et maternité de l'hôpital Amor GUERGUEB -BISKRA.

3.1. Préparation des échantillons:

- après récupéré le sérum, en dilue l'échantillon à un facteur (1/10) puis à l'aide de la spectrophotométrie automatique on mesure la concentration des paramètres LDH, TGO, TGP et détermine la concentration de CPK par spectrophotométrie manuellement et calibrer l'automate d'analyse par l'étalon et contrôle pathologie.

3.1.1. Dosage du Créatine phosphokinase (CPK):

La créatine kinase (CK) catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate de phosphocréatine à l'ADP selon la réaction.



L'activité catalytique de la CK est déterminée en mesurant la vitesse d'apparition du NADPH+H⁺ 0 340 nm .Il existe plusieurs isoenzymes de la CK. Principalement trois fractions sont connues :

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

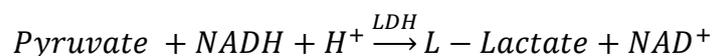
Des valeurs élevées de CK sont observées dans les maladies du muscle squelettique et après infarctus du myocarde .

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

3.1.2. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH) :

Le dosage du lactate déshydrogénase a été réalisé par la méthode cinétique

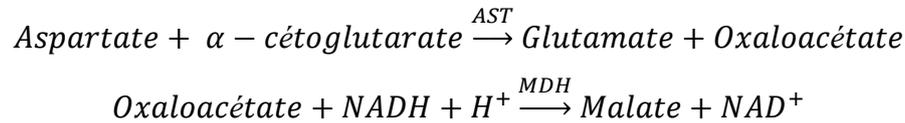
Principe : le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction suivant:



3.1.3. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) :

Le dosage de l'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique

Principe : l'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH+ H⁺ selon les réactions suivantes :

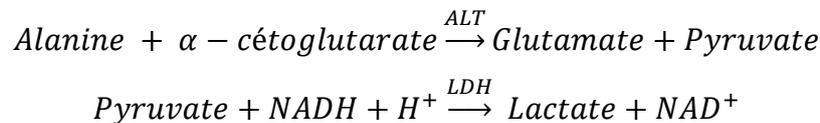


Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'aspartate aminotransférase.

3.1.4. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) :

Le dosage de l'alanine aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique

- Principe : l'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions suivantes :



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de la lactate déshydrogénase

❖ préparation les enzymes et les réactifs:

Tous les dosages des paramètres biochimiques ont réalisés selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

4. Technique histologique:

Pour l'étude histologique, des échantillons de tous les groupes sont prélevés. Les organes doivent être rapidement prélevés notamment qui s'effectue après quelques instants de la mort de l'animal, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 10%, l'examen anatomo-histo-pathologique est effectué au service d'Anatomie pathologique, La technique est réaliser par les étapes suivantes :

4.1. Prélèvement :

Les organes sont coupés en petits morceaux, le cœur a été coupé en deux morceaux et le foie de trois à cinq morceaux selon leur taille.

4. 2. Fixation:

Après le marquage de cassette réalisée dans le formol à 10 % qui se polymérise avec les polypeptides entraînant leur insolubilité

4. 3. Circulation (pendant 24 h):

Poser les cassettes sur l'appareille de circulation

-La première étape, les cassettes dans le formol au cours de 2 heures.

-La deuxième à septième étapes déshydratation dans l'alcool au cours de 2heurs (70% ,80%, 90% ,100% ,100% ,100%).

-La huitième étape poser les cassettes dans 1/2 alcool et 1/2 L xylène au cours 2 heures.

-La 9^{ème} et 10^{ème} posé dans xylène à 2heurs.

-La 11^{ème} et 12^{ème} posé dans la paraffine à 2 heures.

4.4. L'enrobage:

Pour la facilité de manipulation, ouvrir le cassette après la circulation enlève le couvercle et déposer et orientée du tissu sur un moule après verser le paraffine et inclusion du tissu à l'aide de cassette (démoulage du bloc) après refroidissement de paraffine.

4.5. Les coupes ou microtome:

Installé le résoire, régler l'ongle sur 5µm et déposer le bloc de paraffine sur l'appareille et surchargé de paraffine après régler l'ongle sur 3 à 4 µm et couper, déposer les coupes sur l'eau chauffée à 40 °C et coller sur lame après sécher sur l'étuve à 75 °C pendant 1 heure

4.6. La coloration:

-Déparaffinage : pour enlève le paraffine du tissu par le xylène à 15 min.

-L'hydratation : pour retirer le xylène et remplacer par l'eau par l'alcool (éthanol) à 2min +alcool (2min) +alcool (2min) +lavage par l'eau de robinet (1 min).

-Coloration : par l'hématoxyline à 1min pour coloré le noyau en bleu après lavage (1 min) après coloré par éosine (1.5 min) pour coloré le cytoplasme en rose puis lavé à 1 min.

4.7. L'éclair-cément:

Utilise le xylène pour la facilité et éclaircissement de la lecture.

4.8. Montage:

Pour la fixation avec une substance et une lamelle, coller la lame et lamelle par l'eukit.

4.9. La lecture :

Placer la lame sur le microscope pour la lecture de la coupe par différents grossissements.

5. Stress Oxydatif:

5.1. Préparation du tampon phosphate 0.1M, PH 7.4 contenant du KCl 1.15%:

- Dissoudre 11,98 mg de phosphate sodique monobasique dans un 1L de l'eau distillé.
- Dissoudre 14,196 mg de phosphate sodique dibasique dans un 1L de l'eau distillé.

(Dissoudre 5,99 mg de phosphate sodique monobasique dans un 500 mL de l'eau distillé et Dissoudre 7,098 mg de phosphate sodique dibasique dans un 500 mL de l'eau distillé) pour un 1L (la moitié).

- à l'aide de pipette on verse doucement la solution phosphate sodique NaH_2PO_4 a PH [8,9- 9] a la solution phosphate sodique Na_2HPO_4 ; a PH= 2,8; et ajoute quelque goutte de NaOH (1N) jusqu'à la PH régulé a 7,4.
- ajoute KCL (1,15%) donc 11, 5 mg pour 1L de tampon phosphate sodique

5.2. Préparation de la fraction cytosolique de tissus:

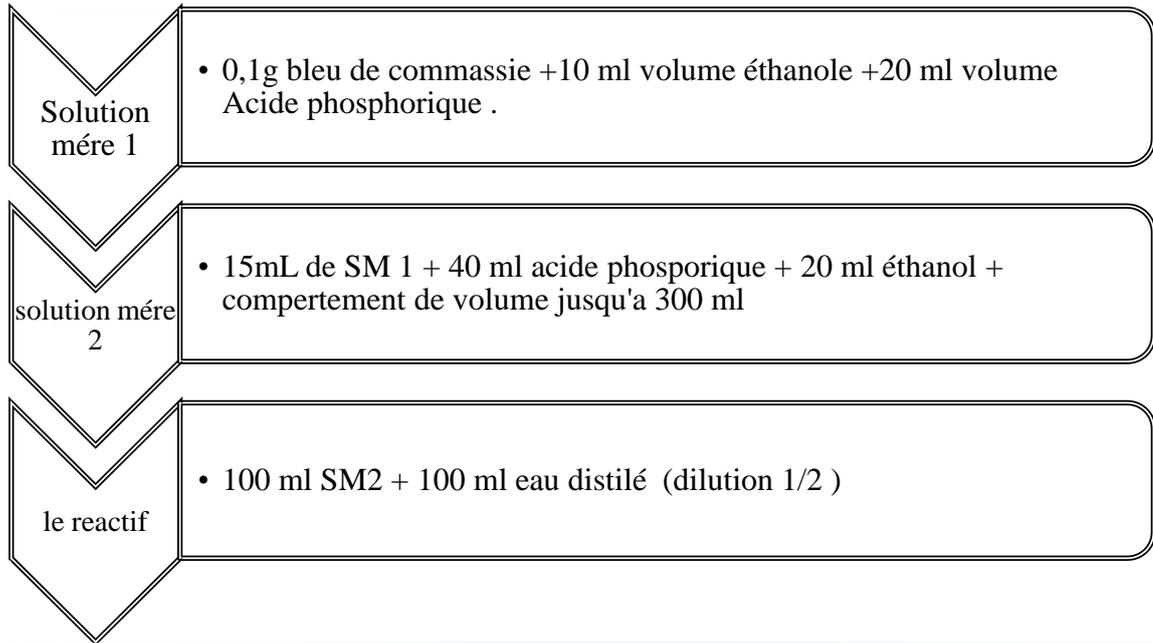
Les fractions cytosolique est effectué selon la méthode de **Sanmugapriya et Venkataraman(2006)**. Au moment du sacrifice les organes (cœur et foie) sont récupérés, ils sont pesés ensuite conservé a (-20 C°) puis découpé en trois petits morceaux (le foie) et un morceaux (le cœur); puis chaque morceaux d'organe est entré dans l'ependorff congelé à l'aide de l'azote liquide puis broyé manuellement par tige en verre, puis additionne à 1,2 ml pour le foie et 0,6 ml pour le cœur de solution tampon phosphate 0.1M PH 7.4 contenant du KCl 1.15% et le mélange est homogénéisé. L' homogénat est centrifugé à 4000 tours /minute pendant 10 minute à 4C°. La fraction cytosolique est récupérée et utilisée pour les dosages des protéines tissulaires, les dosages du taux de TBARS tissulaires ou malonalaldéhyde (MDA), la concentration de glutathion peroxydase (GPx).

5.3. Dosage des protéines tissulaire:

Principe: Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) permet de déterminer des concentrations tissulaires de protéines. C'est une méthode colorimétrique, qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif qui s'associe au groupement amine ($-\text{NH}_2$) des résidus protéiques pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). L'absorption est mesurée à 595nm. (**Bradford, 1976**).

5.3.1. Solution BSA (1 mg/mL) :

Dissoudre 4 mg BSA dans 4 ml d'eau distillée.



5.3.2. Préparation de réactif de Bradford pour dosage de protéine :

Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4 °C et à l'abri de la lumière.

▪ Mode opératoire de dosage de protéine tissulaire :

- ✓ dilution d'échantons par tampon phosphate à pH7,4
- ✓ 500µl d'échantons
- ✓ 500µl réactif Bradford
- ✓ incubation a 10min

- lire densité optique à longueurs d'onde 595 nm.

5.4. Dosage des paramètres de stress oxydatif

5.4.1. Dosage des TBARS tissulaires :

Principe : Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 532nm (Yagi, 1976).

Mode opératoire:

- Dans tubes en verre ajout 250µl d'échantillon pour tube de réaction ou 250µl de tampon TBS (Tris- buffered saline) pour tube blanc.
- ✓ 100µl de tampon TBS (PH = 7,4).
- ✓ 250µl de TCA-BHT pour déprotéiniser le cytosol.

- ✓ 80µl de HCL (0,6M) et 320µl du Tris-TBA.
- ✓ Laisser pendant 15 min dans un bain marie a 100 C°.
- ✓ Laisser les tubes pendant 30 min dans un l'eaufroide.
- ✓ Centrifuger a 4 C° durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✓ Prélever surnageant, Puis lire les densités optiques à longueur d'onde de 530 nm .

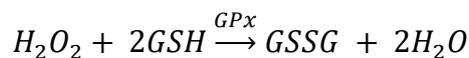
Cette densité optique qui correspond à la formation du complexe (TBA –MDA) est directement proportionnelle à la concentration de MDA et donc de lipides peroxydés. Le calcul des TBARS se fait selon la réaction suivante :

$$MDA (nmol/mg \text{ protéines}) = \frac{DO \times 10^6}{E \times L \times X \times F_d}$$

DO: densité optique lue à 530 nm; E coefficient d'extinction molaire du MDA ($E = 1,56 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$); L : Longueur du trajet optique (L=1 cm); X: $(V_{S1} \times V_S) / (V_f \times V_F)$ avec V_{S1} : volume de prise de l'échantillon (250µl); V_S : volume prélevé du surnageant (450µl); V_f : volume finale à l'incubation à 100 C° (1000µl); V_F : volume final intermédiaire à la centrifugation (1000µl); ici $F_d = 0,2083$.

5.4.2. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) :

Principe : l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée parla méthode de Flohé et Günzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction deperoxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier esttransformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Mode opératoire :

- ✓ Prélever 0.2 mL de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.4 mL de GSH (0.1 mM).
- ✓ Ajouter 0.2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- ✓ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ✓ Ajouter 0.2mL de H_2O_2 (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10minutes.
- ✓ Ajouter 1 mL de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.

- ✓ Prélever 0,48 mL du surnageant.
- ✓ Ajouter 2,2 mL de la solution tampon TBS.
- ✓ Ajouter 0,32 mL de DTNB (1 mM)
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.
- ✓ Calcule de l'activité enzymatique de la GPx: la détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$Q = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ étalon}) \times 0,04 \times 5}{DO \text{ étalon} \times 10}$$

Q Quantité de GSH disparue (oxydée)

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

DO étalon : Densité optique de l'étalon.

0.04 Concentration du substrat (GSH).

$$L'activité \text{ de la GPx } (\mu\text{M GSH}/\text{min}/\text{mg protéine}) = \frac{Q}{\text{Mg protéine}}$$

6. Analyse statistique des résultats :

Toutes les expériences ont été faites en triple, Les résultats ont été exprimés en moyenne avec son écart type (n = 8) pour chaque cas. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test ANOVA suivie par le test Post Hoc Tukey. La valeur peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

- ✓ ($p > 0.05$) désigne un effet non significatif (ns).
- ✓ ($p \leq 0.05$) désigne un effet significatif (*).
- ✓ ($p \leq 0.01$) désigne un effet très significatif (**).
- ✓ ($p \leq 0.001$) désigne un effet hautement significatif (***)

L'ensemble des traitements statistiques est réalisé à l'aide du logiciel Excel statistica.

Chapitre 4

Résultats et discussions

1.1 Rendement de l'extrait :

Le rendement obtenu de l'extrait aqueux est 29,87 %, a été déterminé par rapport à la matière végétale sèche (Figure 3):

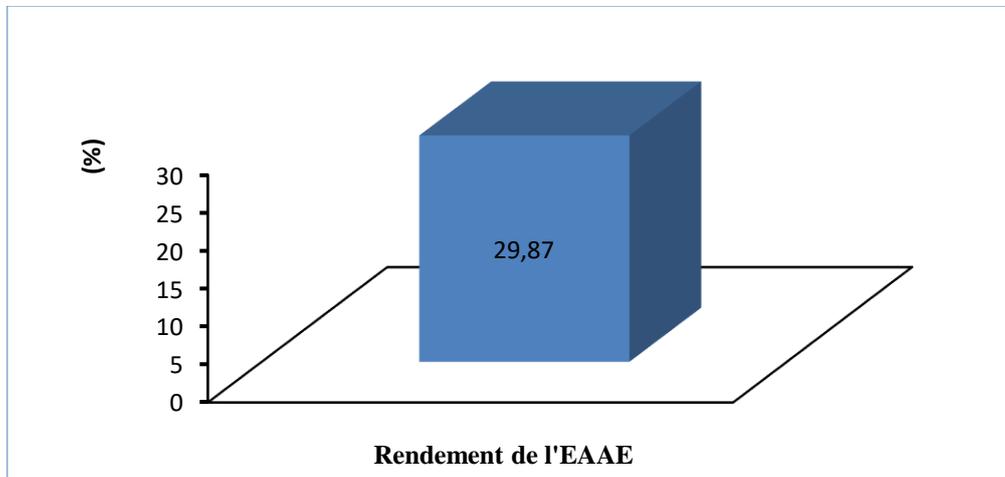


Figure 3: Rendement d'extrait aqueux d'*Astragalus eremophilus*

1.2. Les paramètres toxicologiques:

1.2.1. Détermination de DL₅₀:

1.2.2. Les troubles symptomatiques observés :

Tableau 1 : la dose administré (2000 et 5000 mg /kg) par voie orale et la transformation en Taux de morts dans chaque lots.

Lots	Nombre de souris (n)	Doses (mg /kg)	Nombre de morts	Pourcentages de morts
1	5	2000	0	0
2	5	5000	0	0

Durant l'observation à l'œil nu, aucun trouble symptomatique marqué sur les souris traités.

1.2.3. Influence de la dose administree sur les poids corporels des souris(essai limite)

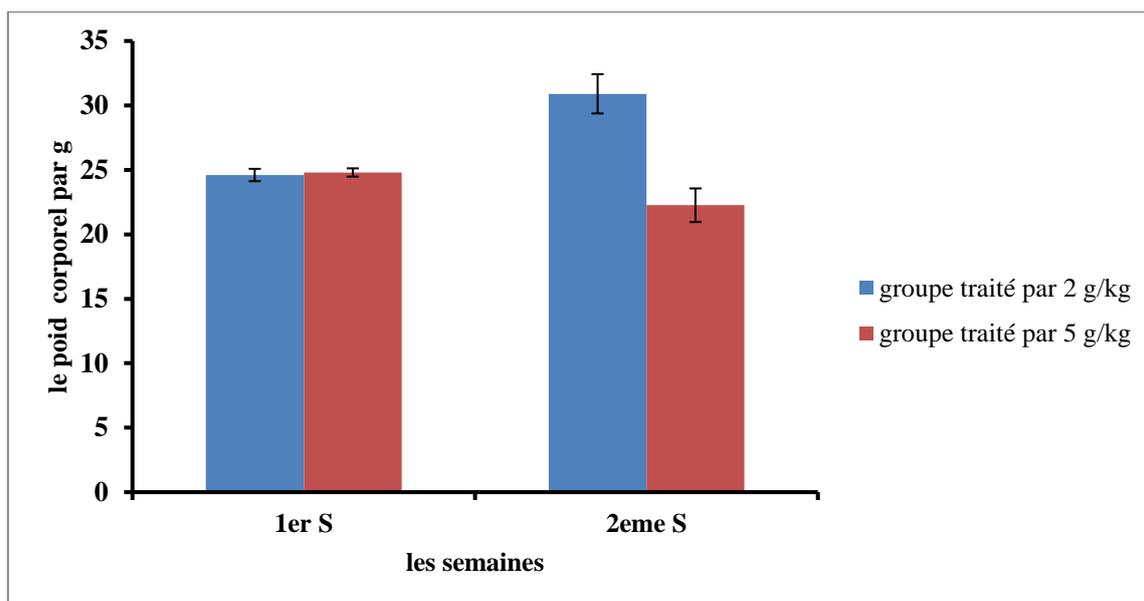


Figure 4 : variation du poids corporel des souris traitées par l'extrait aqueux 2 et 5 g/kg.

Donc: L'EAAE de la plante n'est pas toxique à une dose létale supérieure ou égale à 5000mg/kg

Nos résultats comparés avec ceux de l'extrait aqueux de *Tetrapleuratetrapteura* Taub (Fabaceae) aucun mortalité dans chaque lot ni changement de poids durant le test de la toxicité, aucun symptôme a été marqué; en détermine que la DL_{50} est supérieur à 5000mg /kg (Olivette Laure Matafack Dongmo *et al*, 2019).

Toutefois les astragales sont utilisés comme un agent thérapeutique, sont recommandés dans les cas de: faiblesse et immunomodulateur activité sur le système immunitaire en cancérologie, activité antivirale (Chouana., 2017 ; Saoudi., 2008). Ainsi malgré le fait que l'astragale soit un des remèdes naturels les plus utilisés, on ne reporte cependant aucun cas de toxicité ou de problèmes quelconques liés à son utilisation. On considère donc que cette plante ne présente aucune contre-indication. (Saoudi, 2008)

1.2.4. Influence du traitement sur les poids corporels des souris durant l'expérience :

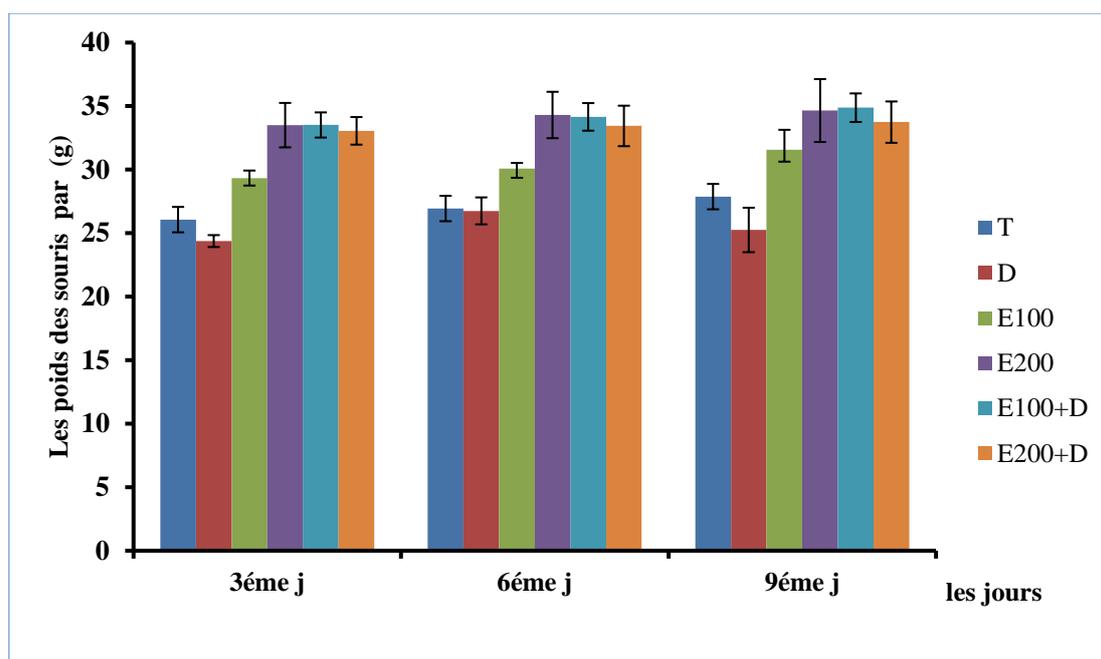


Figure6: Variation du poids des souris durant la période expérimentale.

Après l'administration orale d'EAAE chez les souris durant la période de traitement on observe l'augmentation du poids corporel d'une façon normale pour les groupes E100 et E200. Par contre les groupes traités par l'EAAE combiné avec la doxorubicine et le groupe DOXO ont marqué une faible perturbation du poids ces résultats sont en accord avec la notice du médicament doxorubicine.

2. Influence du traitement sur les paramètres biochimiques :

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, n=8 souris dans chaque groupe. Les résultats du groupe DOXO et groupe d'extrait sont comparé avec ceux du groupe témoin puis les résultats du groupe DOXO sont comparés avec ceux du groupe préventif.

(*) Désigne un effet significatif, (**) désigne un effet hautement significatif,

(***) Désigne un effet très hautement significatif ($p \leq 0.001$), (ns) non significatif.

2.1. Influence du traitement sur la créatinine phosphokinase (CPK) :

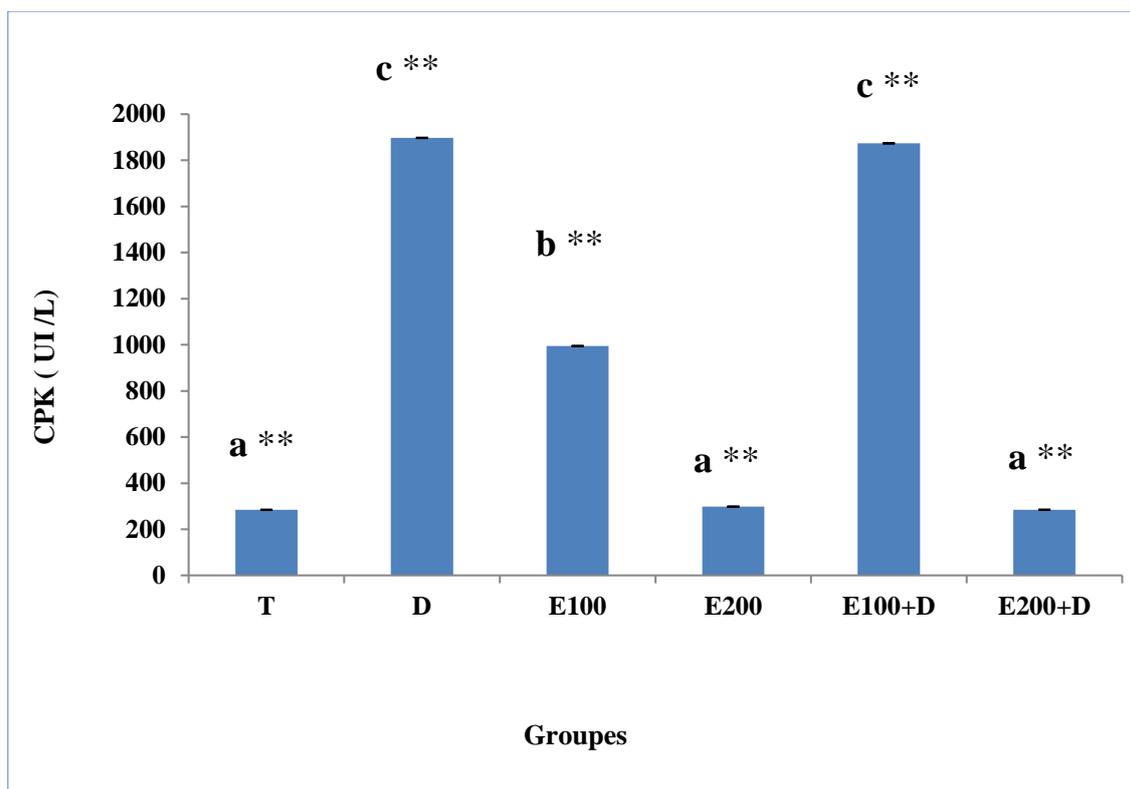


Figure 7 : Effet de l'extrait aqueux de plante *Astragalus eremophilus* (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique CPK chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)

Les présents résultats ont enregistré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux de CPK chez le groupe DOXO ($1897,37 \pm 136,21$ UI/L) par rapport au groupe témoin ($284,5 \pm 6,75$ UI/L). Le groupe préventif E100+D ($1873,75 \pm 199,68$ UI/L) en parallèle avec le groupe DOXO. Par ailleurs il y a une diminution très hautement significative du taux de CPK chez le groupe préventif E200+D ($284,62 \pm 20,71$ UI/L) par rapport le groupe DOXO. Les groupes E100 et E200 ont révélé une augmentation significative du taux CPK et non significative ($994,5 \pm 55,68$ et $298,2 \pm 46,15$), respectivement, par rapport au groupe témoin.

2.2. Influence du traitement sur Lactate déshydrogénase (LDH) :

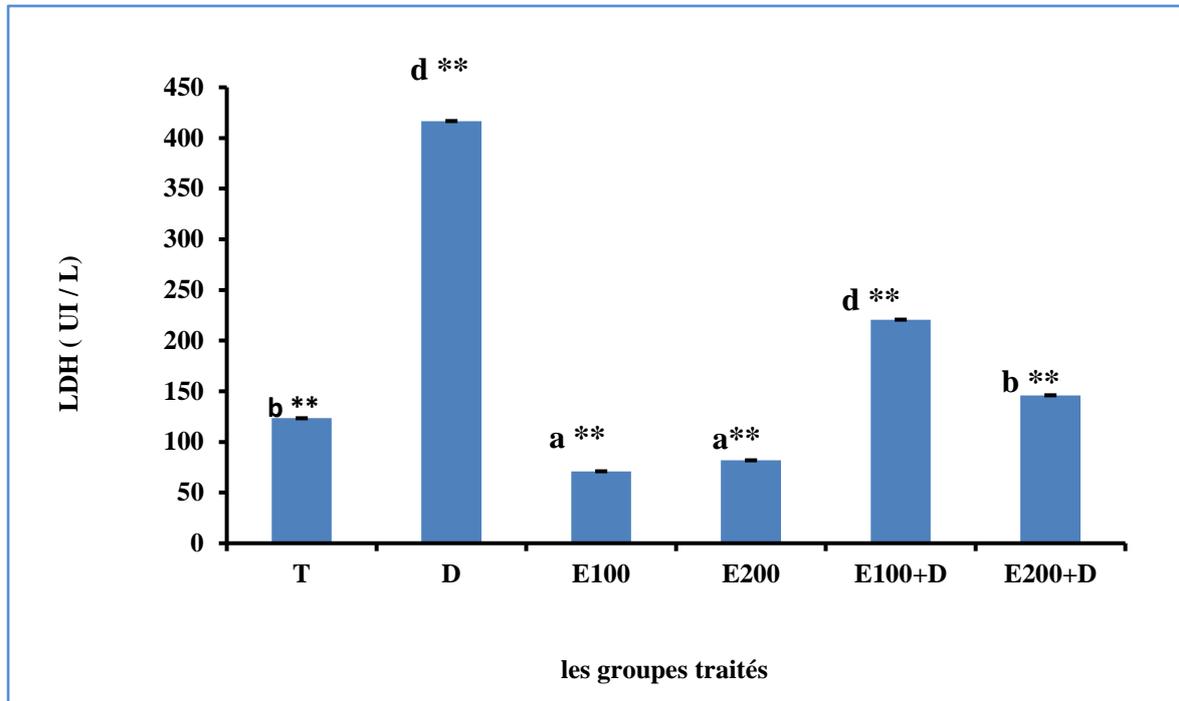


Figure 8: Effet de l'extrait aqueux de plante *Astragalus eremophilus* (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique LDH chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D).

Les résultats obtenus ont démontré une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux de LDH chez groupe le DOX ($416,72 \pm 44,04$ UI/ml) par rapport ($123,35 \pm 6,33$ UI/ml) le groupe témoin. Par ailleurs, le prétraitement des animaux par (E100+D et E200+D) montrent une diminution très hautement significative de la teneur plasmatique de l'enzyme ($220,69 \pm 18,23$ et $146,02 \pm 11,05$ UI/ml) successivement comparés au groupe DOX. Par contre, les groupes E100 et E200 ont démontré une diminution du taux de LDH par rapport au groupe témoin, mais d'une manière significative.

2.3. Influence du traitement sur transférase (TGO) :

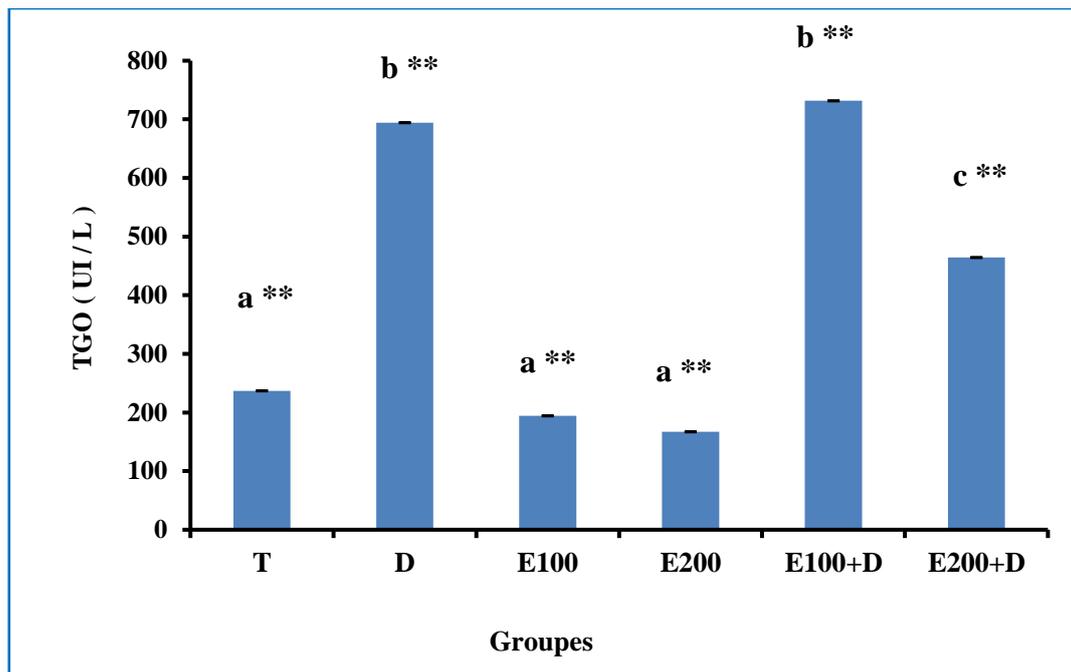


Figure 9 : Effet de l'extrait aqueux de plante *Astragalus eremophilus* (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique TGO chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)

Nous constatons d'après les résultats obtenus une élévation hautement significative ($p \leq 0.001$) de TGO chez le groupe DOX ($694,36 \pm 12,66$ UI /L) par rapport le groupe témoin ($236,95 \pm 19,18$ UI/L). Toutefois le groupe préventif E200+D a révélé une diminution significative de l'activité plasmatique de TGO ($464,32 \pm 41,13$ UI/l) par rapport au groupe DOXO. Ainsi, l'activité de TGO du groupe préventif E100+D a enregistré des taux non significatif ($731,62 \pm 130,04$ UI/l) par rapport le groupe DOXO. D'autre part les groupe E100 et E 200 ($194,3 \pm 22,32$ et $167,08 \pm 26,86$ UI/L) ont révélé une diminution non significative comparé au groupe témoins.

2.4. Influence du traitement sur Glutamatooxatoacétate (TGP) :

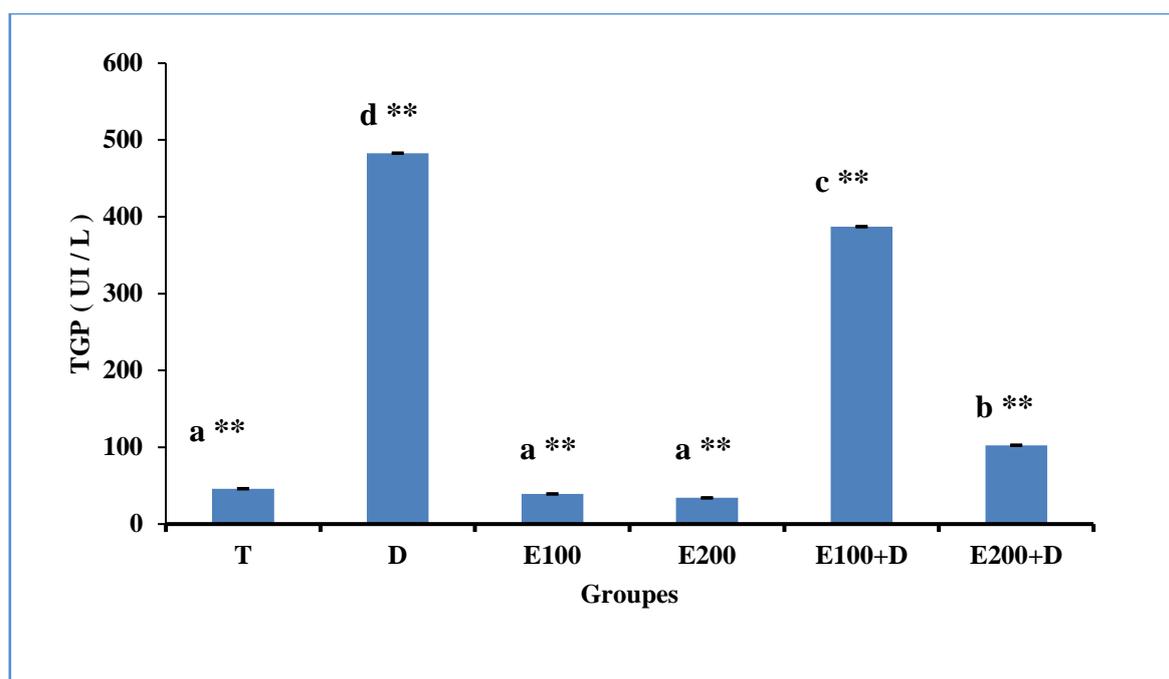


Figure 10 : Effet de l'extrait aqueux de plante *Astragalus eremophilus* (pendant 10 jours) sur l'activité enzymatique TGP chez les groupes (D, E100, E200, E100+D, E200+D)

Les résultats montrent que l'administration de la doxorubicine (15 mg/kg) provoque une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) de la teneur plasmatique de l'enzyme TGP chez le groupe DOXO ($482,86 \pm 21,91$ UI/L) comparé au groupe témoin ($46,01 \pm 6,72$ UI/L). Tandis que l'activité enzymatique de TGP les groupes E100 et E200 ($39,23 \pm 4,59$ et $34,09 \pm 8,64$ UI) respectivement a marqué des valeurs parallèle le groupe témoin. Cependant l'activité de TGP du groupe préventif E100+D et E200+D ($387,2 \pm 13,49$ et $102,625 \pm 34,14$ UI/L), respectivement, ont révélé des diminutions significatif et très significatif par rapport au groupe DOXO.

Discussion :

Étant donné que l'une des principales causes de la cardiotoxicité et l'hépatotoxicité par la doxorubicine est le stress oxydant causé par une production excessive des radicaux libres. En fait, plusieurs études ont été menées afin de trouver des agents protecteurs contre cette cardiotoxicité et hépatotoxicité (Kara Ali, 2016) et une déficience de la fonction hépatique peut entraîner une diminution de la clairance de doxorubicine et de ses métabolites. (notice de médicament).

Les présents résultats ont révélé une augmentation de l'activité enzymatique de l'CPK et LDH, TGP et TGO chez les souris traitées par la doxorubicine (15 mg/kg). L'augmentation

de l'activité de ces enzymes cardiaque et hépatique dans le sang comporte un risque de cardiotoxicité (monographie de produit,2019) et hépatotoxicité pratiquement à la formation massive des radicaux libres issus de métabolisme de la doxorubicine qui affaiblit le fonctionnement des membranes par l'augmentation de sa perméabilité et par la diminution de l'activité des enzymes et des récepteurs liés aux membranes (Pallavi et al. 2003). Ces présents résultats sont en accord avec les résultats de (Ioanna et al. 2007).

Des études antérieurs ont montré qu'il existe des substances potentiel cardioprotecteur, et ce, sans diminuer l'activité anti-tumorale de la doxorubicine sur les cellules cancéreuses.(monographie de produit,2019).

L'EAAE a montré l'effet préventif contre la toxicité cardiaque et hépatique induite par la doxorubicine (Kara Ali, 2017). L'effet préventif de l'extrait peut être dû à la richesse du genre *Astragalus* par les métabolites secondaires tels que les polyphénols, flavonoïdes et les terpènes (Xiaoxia *et al.* ,2014).

3. Influence du traitement sur le paramètre de stress oxydatif :

Le stress oxydatif a été suggéré comme un des principaux mécanismes de toxicité provoquer par le doxorubicine. Dans la présente étude on a montré un état de stress oxydatif chez les souris traité par la doxorubicine.

3.1. Variation des concentrations en Malondialdéhyde : (MDA)

Le dosage de l'MDA permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur le plus utilisé pour déterminer le stress oxydatif. Les variations du niveau de production du MDA cytosolique cardiaque et hépatique après la fin du traitement des souris (après 72 heures).

3.1.1. MDA dans le cœur :

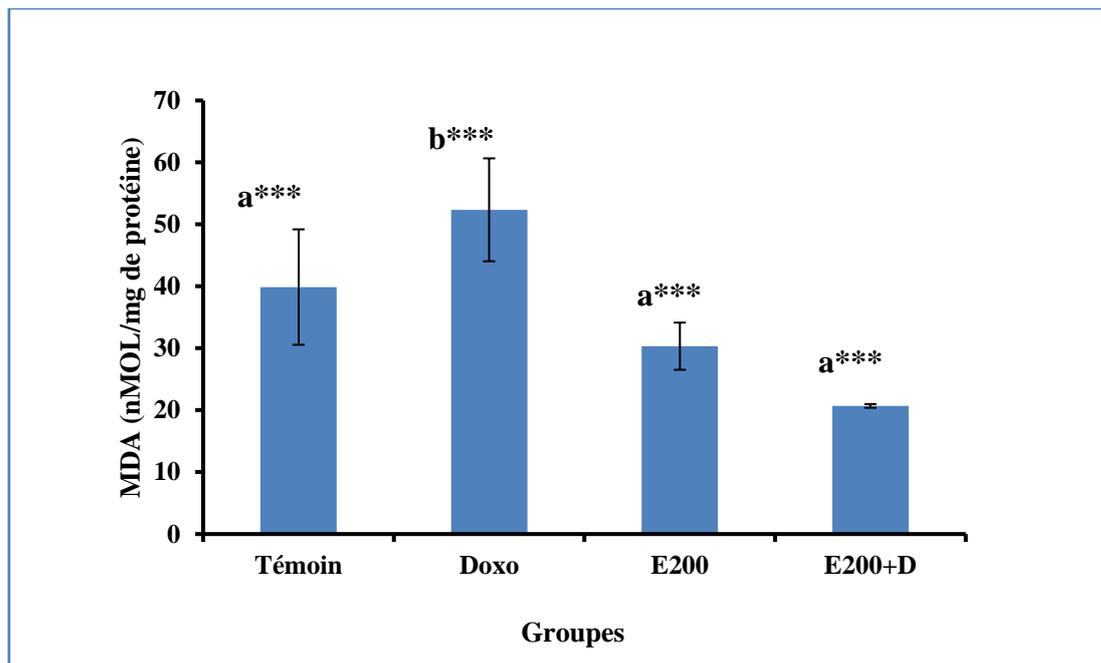


Figure 11 : Variation de MDA (nmol/mg de protéine) dans le tissu cardiaque témoin et traité (D, E200, E200+D) après 10jour de traitement.

Dans la présente étude nous avons constaté une augmentation très hautement significative du taux du MDA cytosolique cardiaque, chez le DOXO ($52,35 \pm 8,31$ nmol/mg de protéine) par rapport au groupe témoin ($39,88 \pm 9,32$ nmol /mg de protéine). Cependant le taux de MDA du groupe préventif ($20,69 \pm 0,3$ nmol /mg de protéine) est diminué significativement par rapport le groupe DOX. Cependant le groupe E200 ($30,33 \pm 3,81$ nmol/mg de protéine) a révélé une différence non significative parallèle au témoin.

3.1.2 MDA dans le Foie :

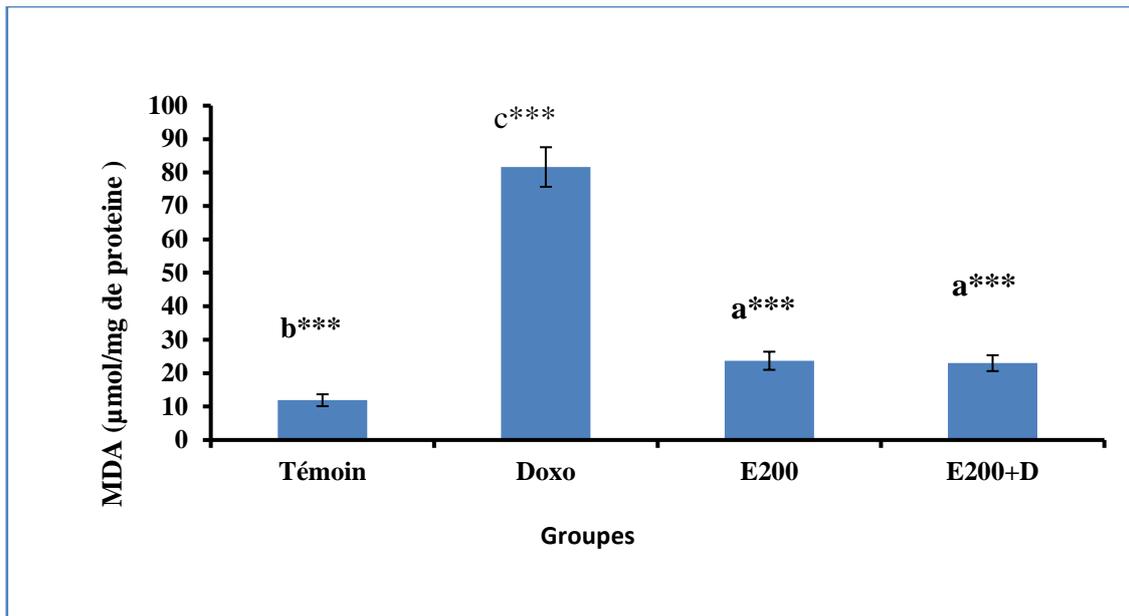


Figure 12 : Variation de taux de MDA (nmol /mg de protéine) dans tissu hépatique témoin et traités (D, E200,E200+D) après 10jour de traitement.

les présentes résultats montrent une élévation très hautement significative ($p < 0.001$) de MDA chez le groupe DOXO ($81,65 \pm 5,92$ nmol/mg de protéine) par rapport au groupe témoin ($11,89 \pm 1,78$ nmol/mg de protéine). Par ailleurs, une diminution significative du MDA chez le groupe préventive E200 +D ($22,98 \pm 2,38$ nmol /mg de protéine) par rapport le groupe DOXO. D'autre part une augmentation significative du groupe E200 ($23,69 \pm 2,71$ nmol/mg de protéine) comparant au témoin.

3.2. Variation des concentrations en Glutathion peroxydase(GPx) :

3.2.1. GPx dans le cœur :

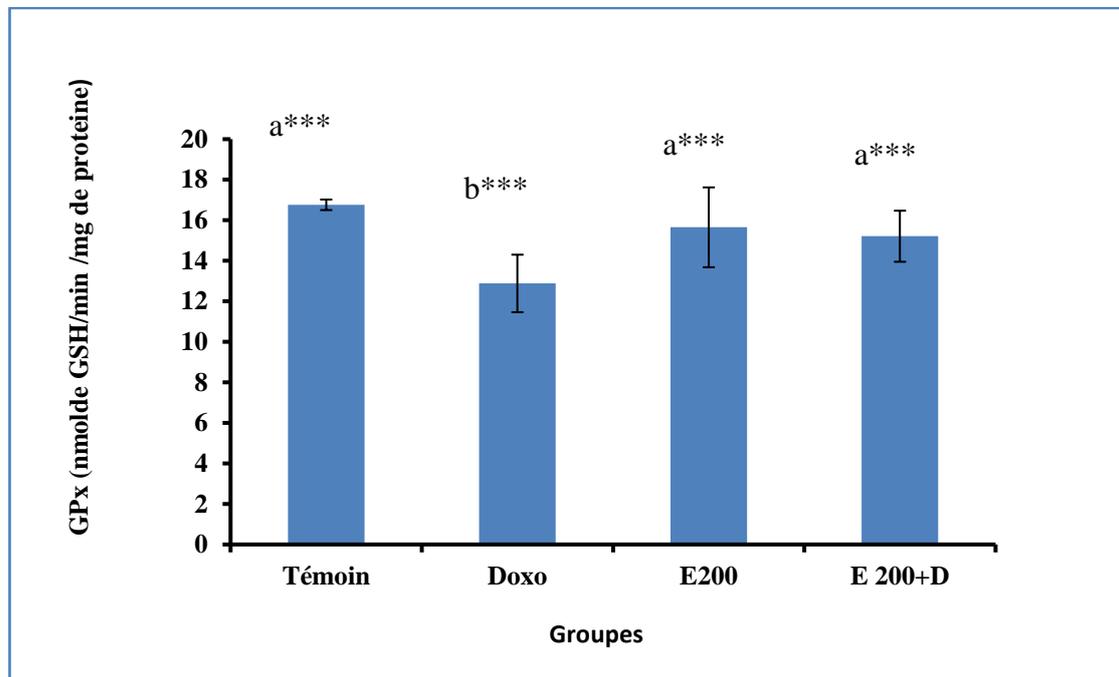


Figure 13 : variation du taux GPx (μmol de GSH / min /mg de protéine)dans le tissu cardiaque témoin et traité (D ,E200,E200+D) après 10 jour.

La Figure 13 illustre que l'activité de la GPx dans l'homogénat du cœur a diminuée hautement significative ($p < 0.001$) chez le groupe DOXO ($12.89 \pm 1.42 \mu\text{mol}$ de GSH / min /mg de protéine) par rapport le témoin ($16.77 \pm 0.26 \mu\text{mol}$ de GSH / min /mg de protéine). Le groupe E200 a marqué une diminution non significative ($15,65 \pm 1,97 \mu\text{mol}$ de GSH / min /mg de protéine) du GPX par rapport le groupe témoins. Cependant une augmentation significative du groupe préventif E200+D ($15,21 \pm 1,26 \mu\text{mol}$ de GSH / min /mg de protéine) de l'activité GPX a été signalé par rapport le groupe DOXO.

3.2.2. GPx dans le foie:

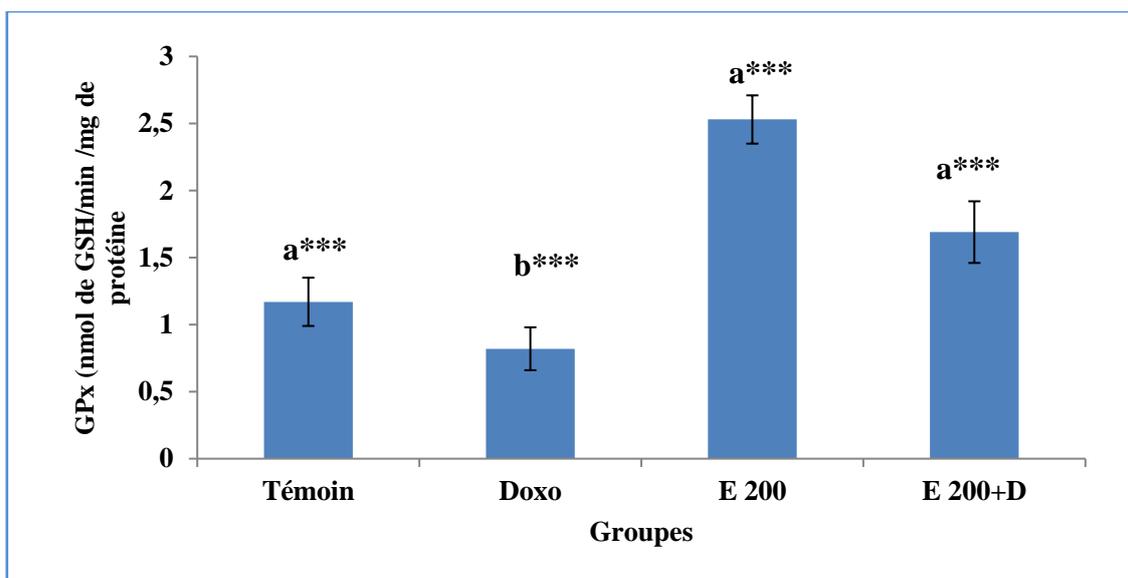


Figure 14: Variation du GPx tissu hépatique ($\mu\text{mol GSH/min /mg de protéine}$) chez les souris témoins et traités (D, E200, E200+D) après 10 jours de traitement.

Les résultats obtenus ont montré une diminution significative ($p \leq 0,001$) chez le groupe DOXO (0.83 ± 0.16) par rapport au groupe témoins (1.17 ± 0.18). Le groupe E200 a enregistré une augmentation non significative (2.53 ± 0.18) par rapport au témoin (il y a une perturbation). Le groupe préventif E200 +D a révélé une augmentation hautement significative (1.7 ± 0.23) par rapport au groupe DOXO.

Discussion:

D'après les résultats obtenus, on constate que l'EAAE a exercé une amélioration considérable sur les taux de MDA et GPX dans le foie et le cœur chez les souris traitées par la doxorubicine.

Ces résultats ont montré que l'EAAE a un effet préventif vis-à-vis du stress oxydatif au niveau du cœur contre la doxorubicine. Le présent résultat est confirmé par l'étude menée de l'effet d'extrait éthanolique de *Boswellia ovalifoliolata* sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine (Bandari et al, 2013).

Selon l'institut européen des substances végétales (Yliesvastra, 2016) issue des Astragales, l'astragaloside IV diminue la production de radicaux libres, la peroxydation lipidique et augmente les défenses anti-oxydantes des cellules hépatiques.

4. Influence du traitement sur l'histologie :

Dans le but d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux d'*A. eremophilus* combiné avec la doxorubicine, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau du foie et du cœur, chez

tous les groupes des souris. L'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents.

4.1. Etude histologique du cœur:

Les résultats de l'étude histologique du cœur des différents groupes sont présentés dans les figures suivantes:

4.1.1. Les coupes histologiques du groupe témoin:

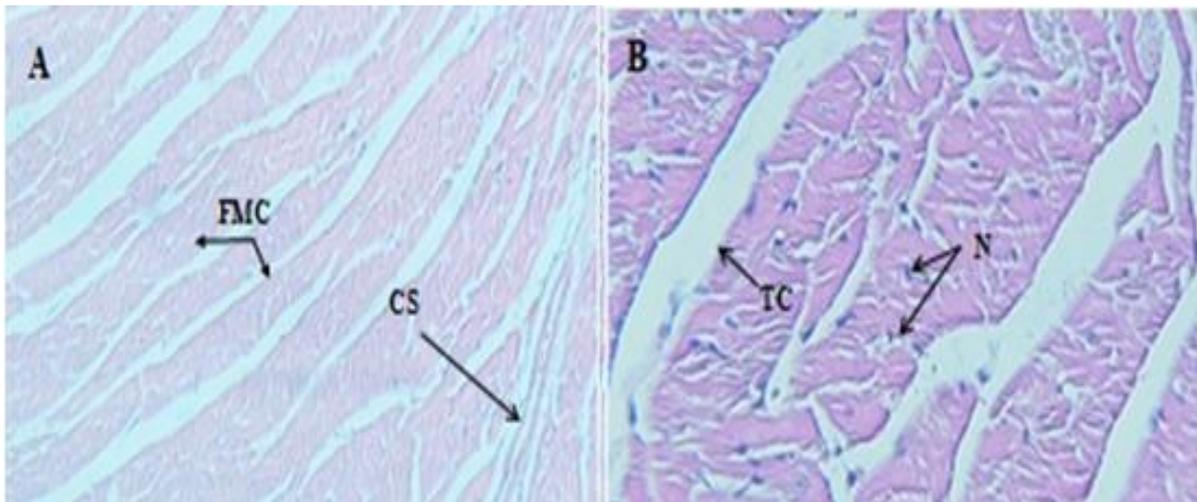


Figure 15: Coupe histologique du tissu myocardique du groupe Témoin.

Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40). TC: Tissu conjonctif, FMC : Fibres musculaires cardiaques. N : Noyaux des cardiomyocytes. CS : Capillaires Sanguins

- Le cœur est composé de plusieurs types de tissus agencés entre eux; on y trouve un tissu de revêtement, de soutien, de conduction et un tissu contractile.
- Le muscle cardiaque est composé de trois couches: de le péricarde, le myocarde et l'endocarde.
- Le myocarde est constitué d'une part de cardiomyocytes (cellules musculaires striées) et d'autre part de l'espace interstitiel.
- Les systèmes de jonction intercellulaire et la charpente conjonctive maintiennent la cohésion et le synchronisme des cellules pendant la contraction et la relaxation .
- Le cytoplasme du cardiomyocytes est occupé par les myofibrilles, constituées de myofilaments fins d'actine qui glissent sur les myofilaments épais de myosine pendant la phase de contraction

4.1.2. Les coupes histologiques de groupe DOXO :

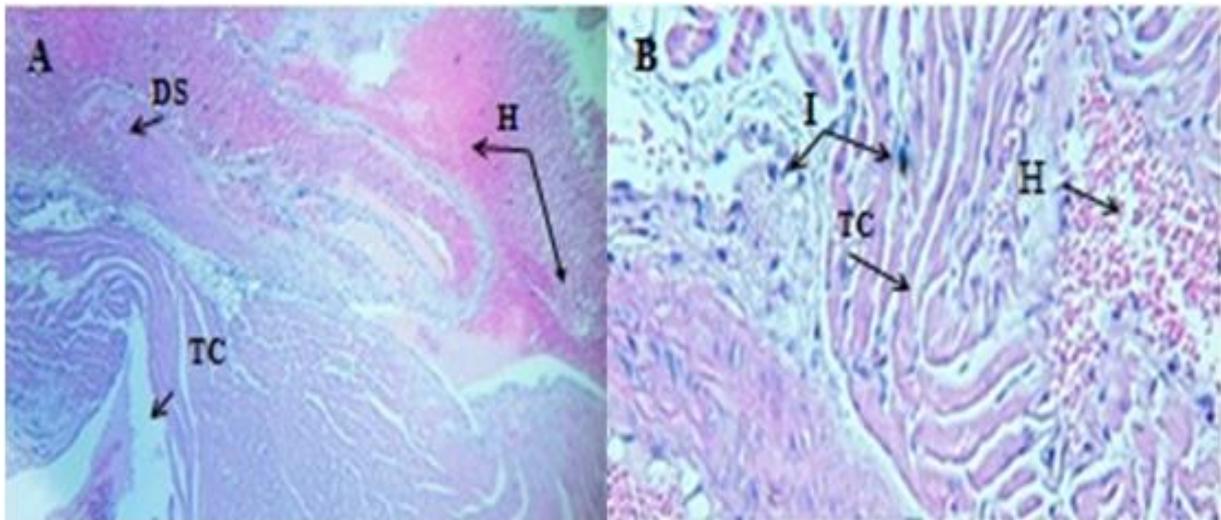


Figure 16 :la Coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par la doxorubicine. Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40) .TC: Tissu conjonctif H: hémorragie, DS : Dystrophie Musculaire I: inflammation

- Chez les souris traitées par la doxorubicine on note 3 lésions histologiques.
- Fibres musculaires dystrophiques sans foyers de fibrose.
- Focalement, des cardiomyocytes gonflés avec des noyaux pycnotiques .
- Au niveau de tissu conjonctif, une congestion vasculaire notable et des foyers hémorragiques

4.1.3. Les coupes histologiques du groupe traité par l'extrait 100mg /kg:

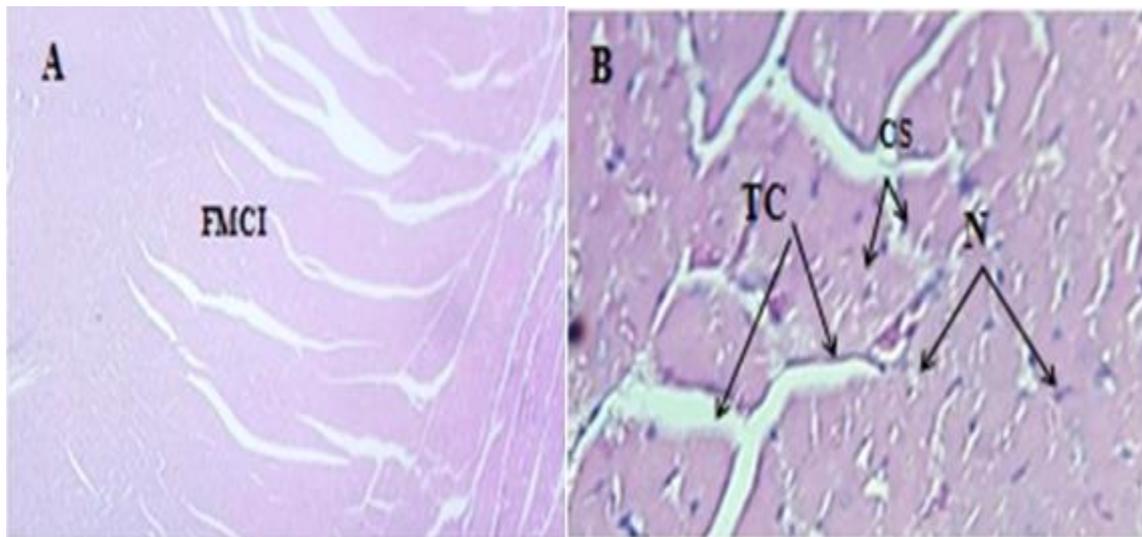


Figure 17 : la coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait 100 mg /kg. Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40).FMCI : Fibres musculaires. Cardiaques intactes, TC: Tissu conjonctif: Noyaux de cardiomyocytes

4.1.4. Les coupes histologiques de groupe E 200 :

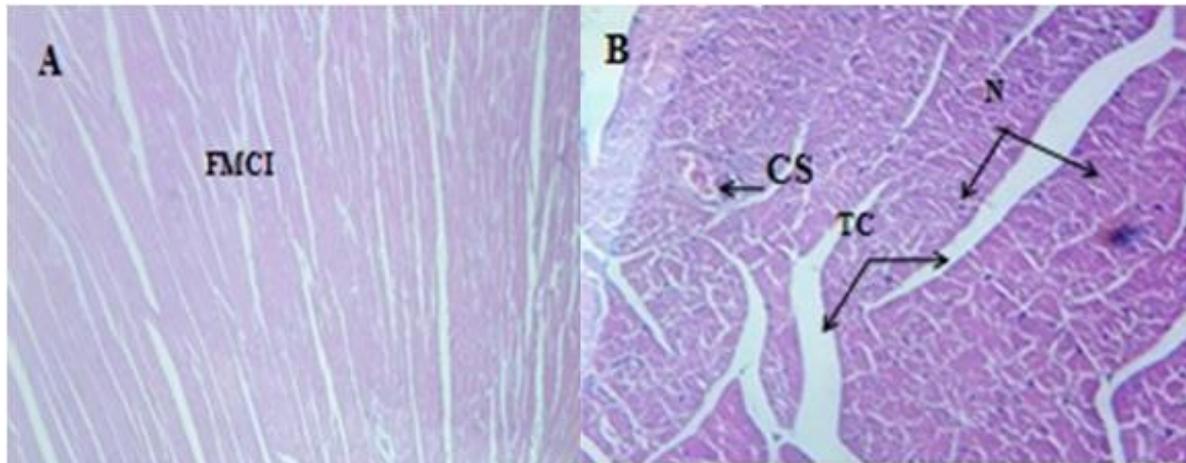


Figure 18 : la coupes histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait 200 mg/kg. Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40) .FMCI : Fibre musculaire cardiaque intacte TC: Tissu conjonctif. Cs : capillaire sanguine N: Noyau

Les coupes histologiques de groupe E100 et E200 :

- Le parenchyme cardiaque dans ce groupe de souris, possède une organisation tissulaire à la limite de la normale proche à celle observée dans le groupe témoin

4.1.5. Les coupes histologiques du groupe E 100 +D:

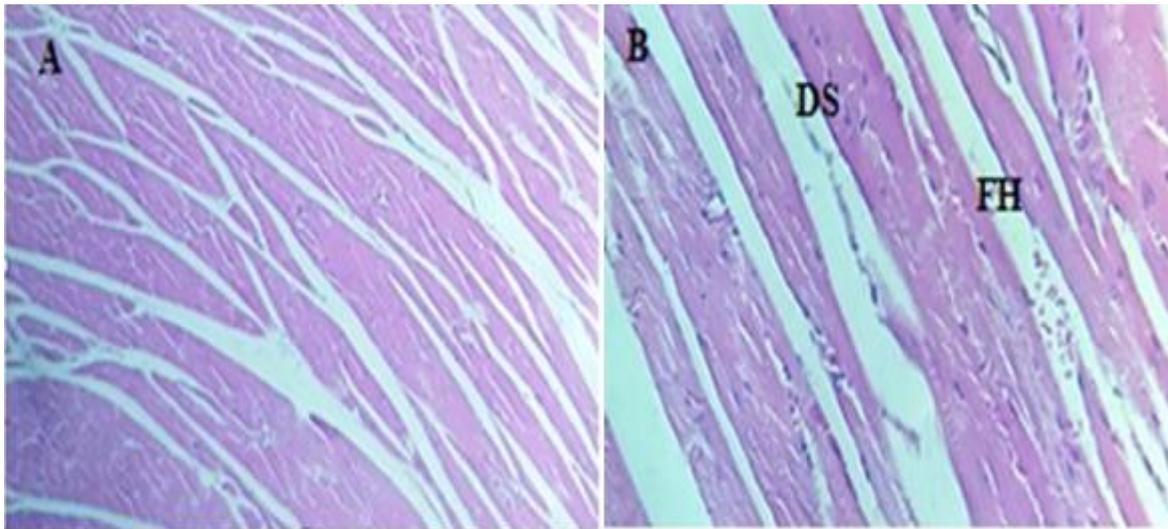


Figure 19 : la Coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait *A. eremophilus* avec Doxorubicine (E100 + D). Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40). DS : Dystrophie du myocarde. FH: foyers d'hémorragie.

Histologiquement, on observe un myocarde présentant des signes de dystrophie myocardique avec une lyse des cardiomyocytes avec des noyaux pycnotiques et quelques foyers de nécrose éosinophile. En plus, des territoires d'hémorragie et d'extravasation des globules rouges dans le tissu interstitiel. Alors, on constate que E 100 mg /Kg a diminué les lésions exercé par la doxorubicine au niveau des tissus cardiaques.

4.1.6. Les coupes histologiques de groupe E200+ D :

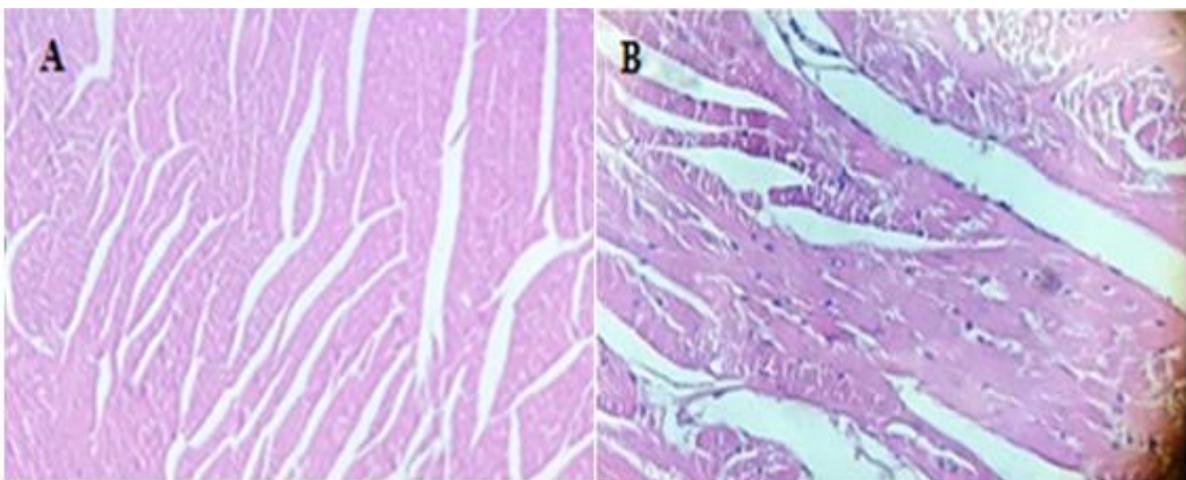


Figure 20 : la coupe histologique du tissu myocardique du groupe traité par l'extrait l'*A. Eremophilus* avec doxorubicine (E 200 + D).Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40)

- Les cellules myocardiques sont allongées et associées les unes aux autres pour former des travées anastomosées séparées par du tissu conjonctif vascularisé. Sur ces travées, la striation est conservée
- Notons un discret infiltrat inflammatoire fait de cellules lymphocytaires
- Absence de foyers de nécrose ou de dystrophie musculaire.

4.2. Etude hépatohistologique :

Les résultats de l'étude histologique du foie des différents groupes sont présentés dans les figures suivantes:

4.2.1. Les coupes histologiques de groupe témoin :

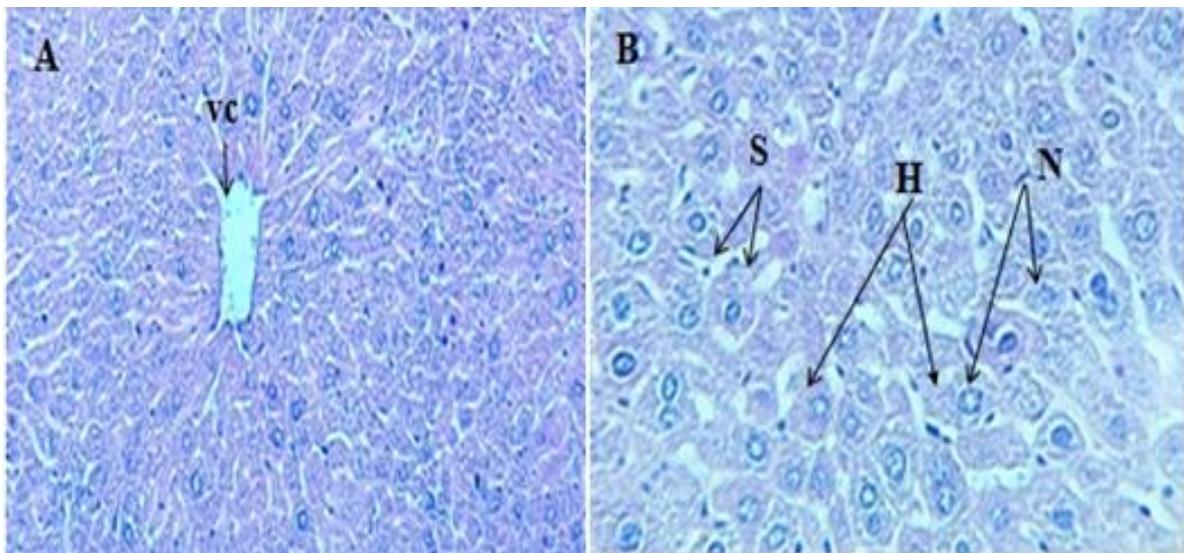


Figure 21 : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe témoin.

Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G × 40) H : les hépatocytes apparaissent roses avec un ou 2 noyaux centraux ; VC : veine centro-lobulaire, S: sinusoides ; N : Noyau.

- Le parenchyme hépatique est organisé en lobules sans séparation visible, schématiquement hexagonaux, avec un espace porte à chaque sommet.
- Ces lobules sont centrés par une veine Centro lobulaire. Entre les espaces portes et la veine Centro lobulaire, les travées d'hépatocytes sont séparées par des sinusoides.
- Les hépatocytes sont des cellules polygonales de grande taille organisées en travées de 1 à 2 cellules d'épaisseur. Ce sont des cellules polarisées (pôle basal du côté sinusoidal, pôle apical du côté canaliculaire).
- Le canalicule biliaire est un petit espace intercellulaire, situé entre le pôle canaliculaire de deux ou trois hépatocytes. Ils forment un réseau qui draine la bile synthétisée par

les hépatocytes jusqu'à proximité de l'espace porte. Les canalicules ne sont pas visibles sur une coupe histologique avec la technique habituelle.

4.2.2. Les coupes histologiques de groupe DOXO:

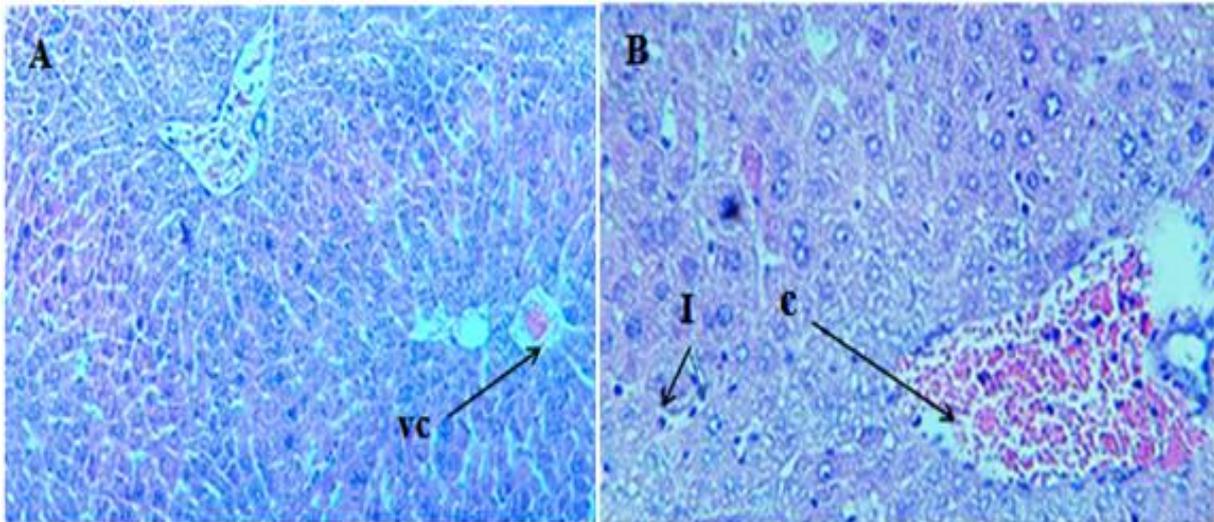


Figure 22: la coupe histologique du tissu hépatique de groupe traité par doxorubicine.

Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40) .C: congestion. I:inflammation

Des modifications dégénératives l'architecture du tissu hépatique ont été marquée ;ce qui est partiellement effacée les veines sont congestives, quelques cellules dépourvues de noyau où l'inflammation est notable .

4.2.3. Les coupes histologiques de groupe E100:

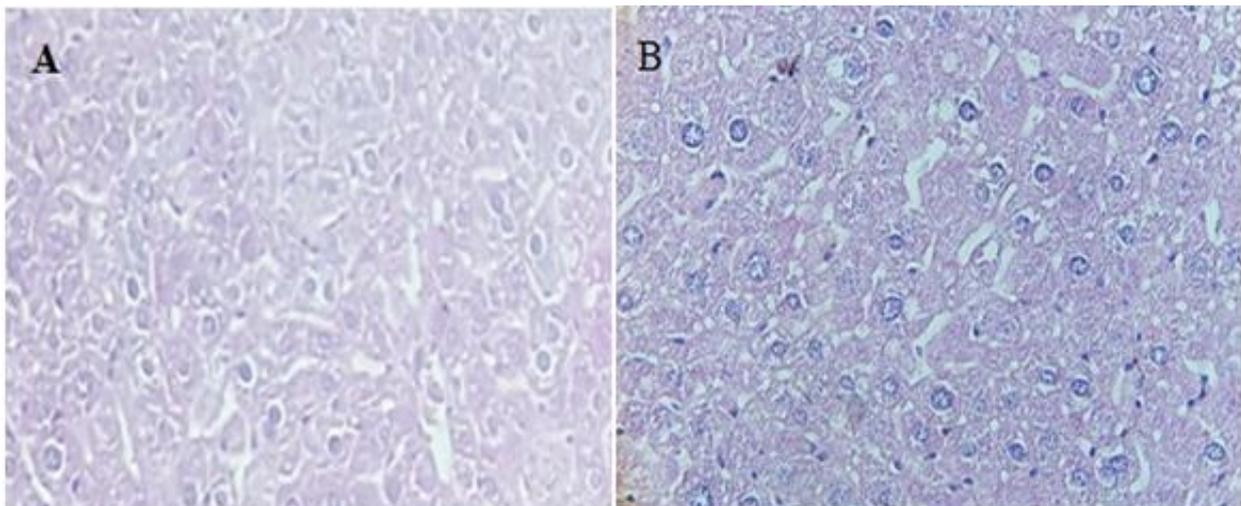


Figure 23: la coupe histologie de tissu hépatique du groupe traité par l'extrait 100 mg/kg.

Coloration hématoxyline éosine A (G ×10) B (G×40).

4.2.4. Les coupes histologiques de groupe E 200 :

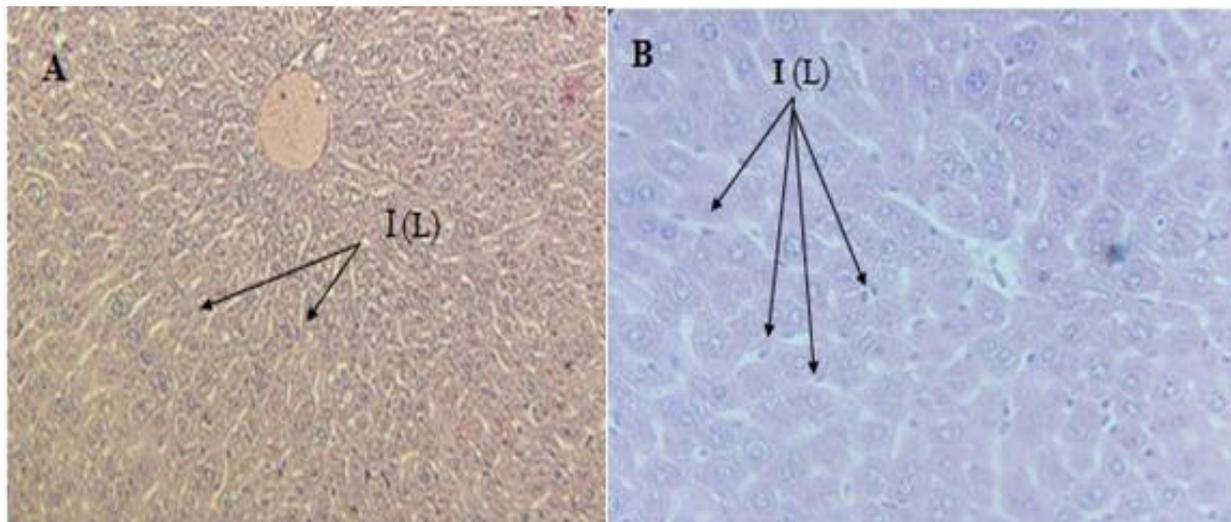


Figure 24 : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe traité par l'extrait 200 mg /kg
Coloration hématoxyline éosine A (G \times 10) B (G \times 40) I (L) : inflammation lymphocytaire

Figure 23 et 24: L'analyse histopathologique du foie des groupes E 100 et E200, présentent un parenchyme hépatique qui a conservé son architecture en général mise à part un discret infiltrat inflammatoire.

4.2.5. Les coupes histologiques de groupe E100 + D:

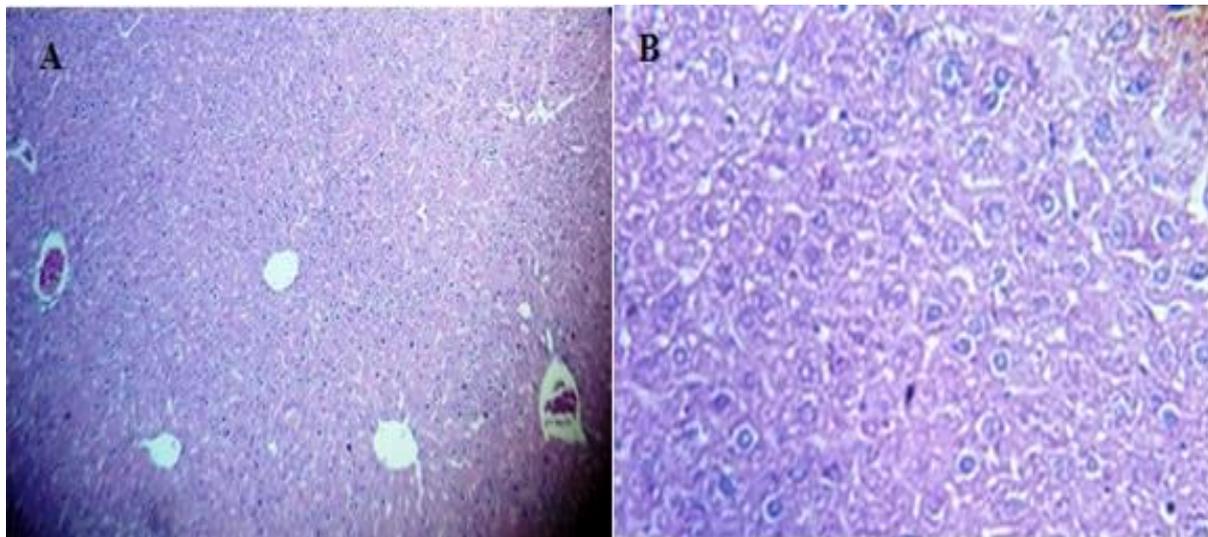


Figure 25 : la coupe histologique de tissu hépatique du groupe traité par l'extrait 100 mg/kg avec la doxorubicine.

4.2.6. Les coupes histologiques de groupe E200 + D :

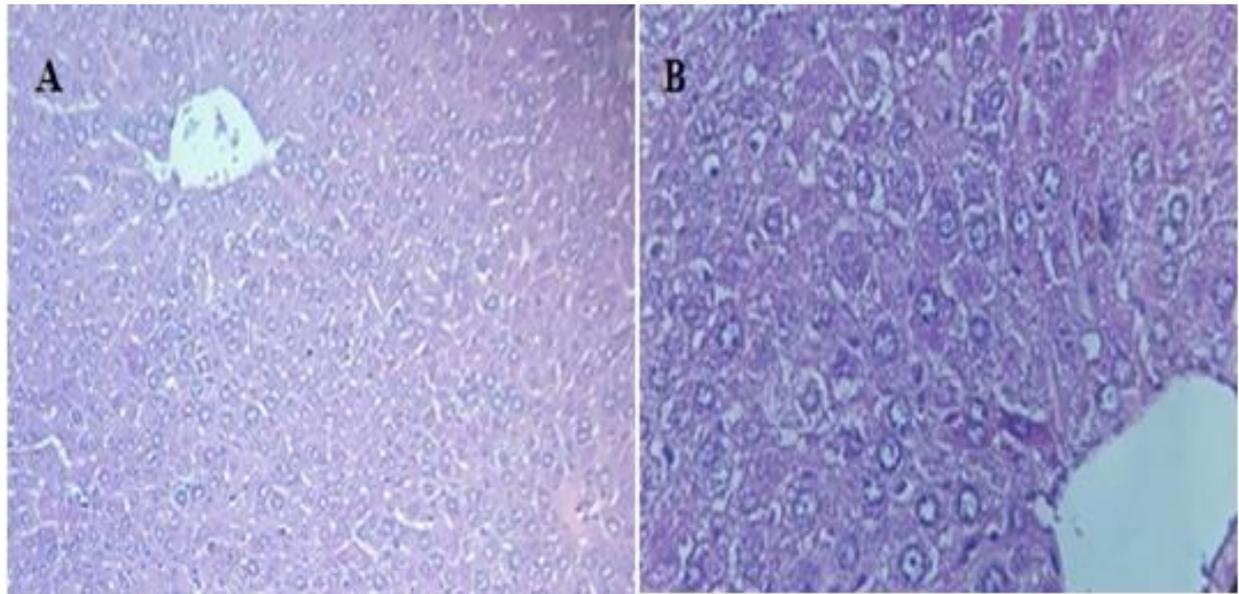


Figure 26 : la coupe histologique de foie du groupe traité par l'extrait 200 mg/kg avec doxorubicine **Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G×40)**

Figure 25 et 26 présentent des lésions modérées au niveau des tissus hépatiques chez le groupe E100+D (congestion, inflammation) qui disparaissent chez le groupe E200+D. Ceci est confirmé l'effet préventif de l'extrait vis-à-vis l'hépatotoxicité (l'effet est dépendant de la dose).

Afin de confirmer les résultats des dosages plasmatiques et tissulaires des biomarqueurs de cardio-toxicité provoqués par la doxorubicine, une étude histologique du cœur et du foie a été réalisée sur six groupes, cités précédemment, par l'utilisation de la coloration de l'hématoxyline et l'éosine. Les résultats ont montré que l'administration de la doxorubicine en une dose unique aux souris a provoqué des changements au niveau de la structure des cardiomyocytes et hépatocytes. Ces modifications histopathologiques confirment les résultats des dosages des paramètres biochimiques et peuvent être vraisemblablement dues aux lésions induites par la production excessive des radicaux libres et à la suite de la peroxydation lipidique induite par la biotransformation de la doxorubicine. (Kara Ali., 2017), a confirmé la présence des lésions histologiques dans la morphologie des tissus cardiaques chez des souris prétraités par la doxorubicine combinée avec l'extrait méthanolique *Ruta montana*.

Conclusion

Conclusion et Perspectives

Il nous est apparu important de commencer notre travail par une préparation d'extrait aqueux de plante *Astragalus eremophilus* et la détermination de la toxicité aiguë de cet extrait *in vivo* par détermination de la DL₅₀.

Evaluer l'effet préventif de l'extrait aqueux d'*Astragalus eremophilus* contre la cardiotoxicité et l'hépatotoxicité induite par la doxorubicine *in vivo* sur des souris *Swiss albinos*.

La doxorubicine est un puissant agent chimio-thérapeutique permet de traiter plusieurs types de cancer, Cependant le développement des effets secondaires qui se traduisent principalement par une cardiotoxicité et hépatotoxicité et la diminution de la sensibilité des cellules tumorales à cause d'une résistance pléiotropique (MDR limite son efficacité dans le traitement du cancer).

Les résultats des essais limites détermine la DL₅₀ est supérieur à 5 g/kg. L'effet bénéfique de l'extrait aqueux dans la prévention du stress oxydant vis-à-vis la cardiotoxicité et hépatotoxicité causés par la doxorubicine se traduit par la modulation des biomarqueurs de stress oxydant (MDA et GPx), et la diminution des activités des enzymes cardiaques (CKMB, ASAT, ALAT et LDH) dans le plasma.

D'autre part, les résultats de l'étude histologique montrent clairement que le prétraitement par l'extrait aqueux d'*Astragalus eremophilus* a pu améliorer le dommage histologique cardiaque et hépatique provoqués par la doxorubicine.

Par ailleurs, les résultats de cette étude reste préliminaire et ne constituent qu'une première étape dans la recherche des substances d'origine naturelle biologiquement active, donc, de nombreuses perspectives expérimentales découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concluant plusieurs points à savoir:

- ✓ Etudier des dosages des substances métaboliques secondaires (polyphénols, polysaccharide...).
- ✓ L'isolement, la purification et l'identification des principes actifs de l'*A. eremophilus* impliqués dans les effets révélés en utilisant des méthodes plus précises telles que High Performance Liquid Chromatography (HPLC) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).
- ✓ Déterminer la toxicité subaiguë.
- ✓ Déterminer d'autres biomarqueurs de stress oxydatif tels que (SOD, GSH, Vitamine E, Vitamine C,...).

Références bibliographiques

Références :

- Bandari, U. 2013.** Ramakrishna sistla ethanolic extract of *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, 840–849.
- BAZIZ K. 2015.** Organisation du génome et étude palynologique de
- Benzidane, Chahrazed. (2012).** thèse de magister, Effet toxique des résidus des pesticides utilisés
- Bouabid. M et Zatout.N. 2015.** L'activité biologique de l'extrait butanolique de la plante *Genista sp.* : Effet sur L'hépatotoxicité induite par la Doxorubicine. Toxicologie et santé. Université des Frères Mentouri Constantine, 70p.
- BOUSSAHEL, S. 2011.** Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif, Université Ferhat Abbas, Sétif Faculté des Sciences, Département de Biologie.
- Carange J. 2010.** Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection. biophysique et biologie cellulaires. Université du Québec, 138p.
- CATHERINE L. 2008.** Etude des mécanismes de toxicité induite par l'adriamycine et sensibilisation des cellules cancéreuses par le choc thermique. chimie. Université du Québec à montreal. 124p.
- Chouana, Tofik. 2017.** Caractérisation structurale et activités biologiques des
- DRIDI n et SEGUENI N. 2015.** Etude de l'effet antitoxique de l'extrait méthanolique de l'espèce *Cotula cinerea* vis à vis le pesticide Chlorpyrifos chez les rats *wistaralbinos*. Biochimie Appliquée. Université echahid hamma lakhdar d'el-oued, 94p.
- KARA ALI Wahiba. (2017).** Effet des extraits de la plante médicinale *Ruta montana* الفيجل (sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine et sur la multi-drug résistances (MDR) des cellules cancéreuses ovarien (A2780). Thèse de doctorat, spécialités, Toxicologie Cellulaire et Moléculaire, Université des Frères Mentouri –Constantine
- LABED A. 2016.** Investigation phytochimique et biologique de l'espèce *Astragalus armatus* ssp. *numidicus* Coss. Et Dur.Maire. et Synthèse catalytique de nouveaux dérivés julolidines. mémoire de doctorat. chimie pharmaceutique. université des frères mentouri-Constantine, 284p.

Marianne M. 2016. Etude de la cardiotoxicité induite par les traitements anticancéreux : Rôle d'Épac dans la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine. *Biologie moléculaire*, 303p. <NNT : 2015SACLS190>. <tel-01412104>.

méridionales (Tome 1). Editions du C.N.R.S. France. N° DE PQAGE

Olivette Laure Matafack Dongmo, et al, (2019), Acute and sub-acute toxicity of the aqueous extract from the stem bark of *Tetrapleura tetrapleura* Taub. (Fabaceae) in mice and rats. 23p.

Ozenda P (1991). flore et végétation du sahara. 3eme édition..

polysaccharides d'*Astragalus gombo* bunge. Thèse de doctorat, Sciences des Aliments) : Université Clermont Auvergne et Université Kasdi Merbah d'Ouargla.

quelques espèces algériennes du genre *Astragalus* L. Thèse de doctorat. Biotechnologies végétales. Université Constantine 1, 127p.

Quézel P, Santa S, 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques

Sahna E, Parlakpinar H, Ozer MK, Ozturk F, et al (2003). Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res* 35:257–61

SAOUDI, M. 2008. thèse de magister, Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*, Université Mentouri de Constantine, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, département de Biologie Végétale.

Singh. G, Singh. AT, Abraham. A, Bhat. B, Mukherjee. A, Verma. R, Agarwal.

SK, Jha. S, Mukherjee. R, Burman. AC. (2008). Protective effects of *Terminalia arjuna* against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Ethnopharmacol*, 17, 117(1):123-129.

sur la flore de la région de Sétif, Université Ferhat Abbas-Sétif, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Végétale et Ecologie.

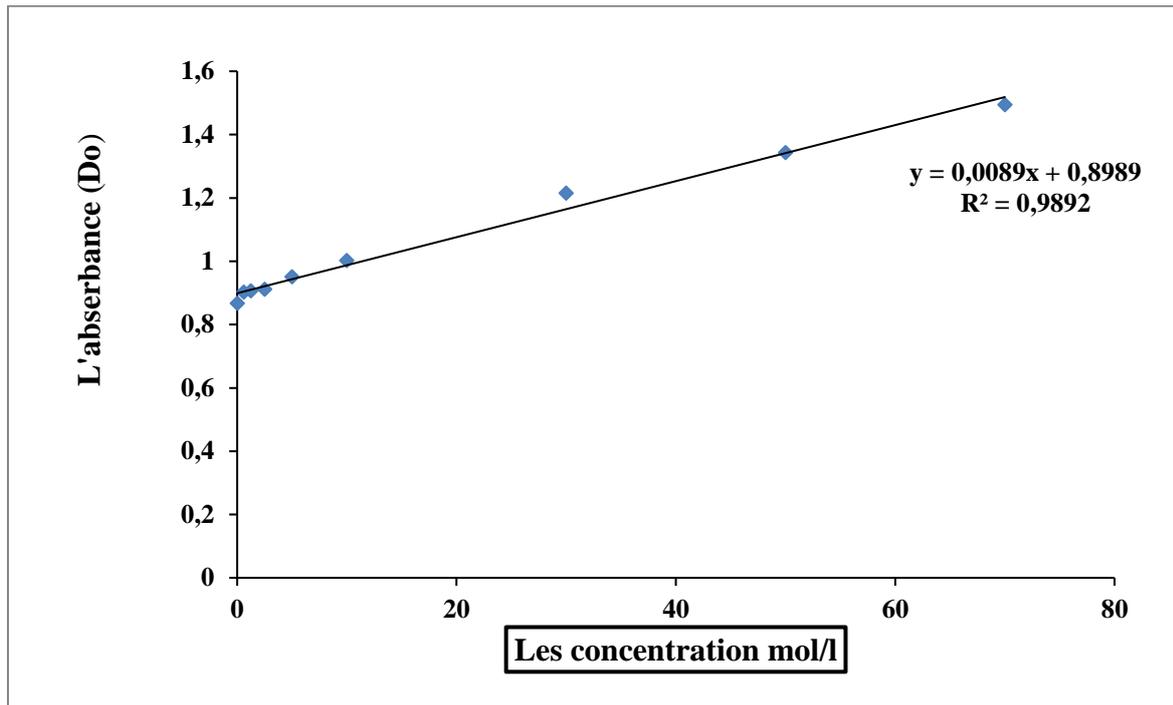
Yilmaz S, A tessalin A, Sahna E, et al 2006. Protective effect of lycopene on adriamycin induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology* 218:164–71.

Annexes

 **Les matériels et Les réactifs:**

Les materials	Les réactifs et produites
<ul style="list-style-type: none"> - Les matériels biologiques -La sonde gastrique -L'automate -La centrifugeuse - L'appareil de circulation - L'appareil d'enrobage -Lemicrotome - Le spectrophotométrie -Tige en verre - Bain marie -La plaque chauffante -La rota vapeur - La lyophilisateur -La balance précise. 	<ul style="list-style-type: none"> -Le formole - Doxorubicine - La transaminase transférase - La créatinine phosphokinase - Lactate déshydrogénase - La transaminase Glutamatooxatoacétate -L'éthanol, xylène -La paraffine - L'hématoxyline et l'éosine -L'eukit - Réactif Bradford -L'azote liquide -Le tampon TCA-BHT -L'acide chlorhydrique (chlorure d'hydrogène) -Le Tris-TBA -Le glutathion -Le TCA -Le DNTB -Le peroxyde d'hydrogène -BSA (bovine sérum albumin) -Acide phosphorique -Bleu de Coomassie

La gamme d'étalonnage



2 Dosage des protéines:

2.1. Dosage protéine du tissu de foie :

Groupe	Concentration protéique de foie (mg/ml)
Témoin	3.76 ± 1.57
Doxo	4.97 ± 0.77
E100	4.46 ± 1.04
E200	4.38 ± 0.24
E100+D	4.68 ± 0.06
E200+D	7.63 ± 2.76

2.2. Dosage protéine du tissu de cœur :

Groupe	Concentration protéique de cœur (mg/ml)
Témoin	0.293 ± 0.056
Doxo	0.617 ± 0.071
E100	0.31 ± 0.07
E200	0,355±0.027
E100+D	0.283 ± 0.019
E200+D	0.56 ± 0.18

ANOVA à un critère des paramétrés biochimiques GTO et GTP

STATISTICA - PAR BIOCH Nadia* - [Univariate Results for Each DV (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)] - [PAR BIOCH Nadia*]

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	Degr. of Freedom	GTO SS	GTO MS	GTO F	GTO p	GTP SS	GTP MS	GTP F	GTP p
Intercept	1	8005178	8005178	802,5060	0,00	1696822	1696822	1201,324	0,00
GROUPE	5	2631640	526328	52,7635	0,00	1724549	344910	244,191	0,00
Error	42	418959	9975			59323	1412		
Total	47	3050600				1783872			

Test Tukey du variable GTO

STATISTICA - PAR BIOCH Nadia* - [Tukey HSD test; variable GTO (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)]

Tukey HSD test; variable GTO (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = 9975,2, df = 42,000

Cell No.	GROUPE	GTO Mean	1	2	3
5	E200	167,0813	****		
3	E100	194,3000	****		
1	T	207,3313	****		
6	E200D	464,3250			****
2	D	685,6198		****	
4	E100D	731,6250		****	

Test Tukey du variable GTP

STATISTICA - PAR BIOCH Nadia* - [Tukey HSD test; variable GTP (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)]

Tukey HSD test; variable GTP (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = 1412,5, df = 42,000

Cell No.	GROUPE	GTP Mean	1	2	3	4
5	E200	34,0963	****			
3	E100	39,2308	****			
1	T	46,0104	****			
6	E200D	102,6250		****		
4	E100D	423,2750			****	
2	D	482,8656				****

ANOVA à un facteur des paramétrés biochimiques CPK et LDH

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

Effect	Degr. of Freedom	LDH SS	LDH MS	LDH F	LDH p	CPK SS	CPK MS	CPK F	CPK p
Intercept	1	149719361	149719361	2041,446	0,00	42285995	42285995	2738,134	0,00
groupe	5	66800149	13360030	182,166	0,00	24498951	4899790	317,275	0,00
Error	42	3080274	73340			648621	15443		
Total	47	69880423				25147573			

Test Tukey du variable LDH

Tukey HSD test; variable LDH (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = 73340, df = 42,000

groupe	LDH Mean	1	2	3	4
3	E100	710,075	****		
5	E200	818,563	****		
1	T	1233,588		****	
6	E200D	1460,238		****	
4	E100D	2206,962			****
2	D	4167,250			****

Test Tukey du variable CPK

Tukey HSD test; variable CPK (Spreadsheet CPK LDH GOMBI)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = 15443, df = 42,000

groupe	CPK Mean	1	2	3
6	E200D	284,625	****	
5	E200	298,200	****	
3	E100	993,113		****
4	E100D	1873,750		****
2	D	1897,375		****

ANOVA a un seul critèredes marqueurs de stress oxydatif MDA et GPx du Foie

STATISTICA - [MDA GPx FOIE* - Univariate Results for Each DV (GPx MDA FOIE)]

Univariate Results for Each DV (GPx MDA FOIE)
Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	Dear. of	GPx	GPx	GPx	GPx	MDA	MDA	MDA	MDA
		MS	F	p	SS	MS	F	p	
Intercept	1	99,38940	99,38940	842,1245	0,000000	28425,96	28425,96	1614,798	0,000000
GROUPE	5	14,36100	2,87220	24,3361	0,000000	12583,60	2516,72	142,968	0,000000
Error	18	2,12440	0,11802			316,86	17,60		
Total	23	16,48540				12900,47			

Test Tukey du variable GPx du Foie

STATISTICA - [MDA GPx FOIE* - Tukey HSD test; variable GPx (GPx MDA FOIE)]

Tukey HSD test; variable GPx (GPx MDA FOIE)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = ,11802, df = 18,000

Cell No.	GROUPE	GPx Mean	1	2	3
2	D	0,712500		****	
6	E200D	1,692500	****		
1	T	1,985000	****		
3	E100	2,122500	****		
5	E200	2,407500	****		
4	E100D	3,290000			****

Test Tukey du variable MDA du Foie

STATISTICA - MDA GPx FOIE* - [Tukey HSD test; variable MDA (GPx MDA FOIE)]

Tukey HSD test; variable MDA (GPx MDA FOIE)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = 17,603, df = 18,000

Cell No.	GROUPE	MDA Mean	1	2	3	4
1	T	11,88500				
5	E200	22,77250	****			
6	E200D	22,98250	****			
3	E100	25,17500	****			
4	E100D	42,05750		****		
2	D	81,61950			****	

ANOVA a un seul critère des marqueurs de stress oxydatif GPx du Cœur

Effect	Degr. of Freedom	GPx SS	GPx MS	GPx F	GPx p
Intercept	1	8195,141	8195,141	1601,333	0,000000
groupe	5	524,773	104,955	20,508	0,000001
Error	18	92,119	5,118		
Total	23	616,891			

Test Tukey du variable GPx Coeur

Cell No.	groupe	GPx Mean	1	2
2	D	10,22750		****
4	E200D	15,52500	****	
3	E200	18,43000	****	
1	T	19,53000	****	

ANOVA a un seul critère des marqueurs de stress oxydatif MDA du Cœur

Effect	Degr. of Freedom	MDA SS	MDA MS	MDA F	MDA p
Intercept	1	16066,20	16066,20	445,7290	0,000000
groupe	3	1901,24	633,75	17,5822	0,000109
Error	12	432,54	36,04		
Total	15	2333,78			

Test Tukey du variable MDA Coeur

STATISTICA - [GPX COEUR* - Tukey HSD test; variable MDA (GPx MDA COUER.sta 2)]

File Edit View Insert Format Statistics Data Mining Graphs Tools Data Workbook Window Help

GPX COEUR*

- ANOVA (GPx)
- ANOVA R
- ANOVA R
 - Univa
 - Tukey
 - Tukey
- ANOVA (GPx)

Tukey HSD test; variable MDA (GPx MDA COUER.sta 2)
Homogenous Groups, alpha = ,05000
Error: Between MS = 36,045, df = 12,000

Cell No.	groupe	MDA Mean	1	2
4	E200D	23,24750	****	
1	T	23,27750	****	
3	E200	30,33250	****	
2	D	49,89500		****

المخلص:

Doxorubicine دواء مضاد للسرطان يستخدم في علاج العديد من الأورام الخبيثة البشرية. ومع ذلك ، فإن استخدامه السريري محدود بسبب العديد من الآثار الجانبية: سمية القلب والسمية الكبدية. في دراستنا، درسنا فعالية وقائية لـ *A. eremophilus* ضد الإجهاد التأكسدي ، والسمية التي يسببها doxorubicine في الفئران باستخدام النهج الكيميائية الحيوية. تعرضت الفئران للعلاج عن طريق الفم للمستخلص المائي للنبات *A. eremophilus* بالجرعات (100 و 200 ملغ / كلغ) لمدة 10 أيام وعن طريق الحقن داخل الصفاق بدوكسوروبيسين (15 ملغ / كلغ) . تم تقييم سمية عن طريق قياس مستويات TGO، TGP، LDH، MDA، CPK والأنشطة المضادة للأكسدة ودراسة المقاطع النسيجية. تظهر نتائج LDH، CPK، TGO ، TGP و MDA زيادة في المجموعات المعالجة doxorubicine مقارنة مع المجموعة الشاهدة ، ونقص عند المجموعة الوقائية المعالجة بالمستخلص المائي مع بدوكسوروبيسين مقارنة مع مجموعة DOXO وتم تأكيد هذه النتائج من خلال الدراسات النسيجية. تشير هذه النتائج بوضوح إلى أن المستخلص المائي لـ *A. eremophilus* يلعب دورًا وقائيًا مهمًا في مواجهة تسمم القلب وتسبب تسمم الكبد باحداث تأثير مضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: دكسوروبيسين ، سمية القلب ، سمية الكبد ، *Astragalus Eremophilus* داخل الصفاق

Résumé:

Doxorubicine est un médicament anticancéreux utilisé dans le traitement de nombreuses affections malignes humaines. Toutefois, son utilisation clinique est limitée en raison de plusieurs effets secondaires: la cardiotoxicité et l'hépatotoxicité. Dans la présente étude, nous avons étudié l'effet préventif de l'*A. eremophilus* contre le stress oxydatif, cardiotoxicité et l'hépatotoxicité induites par la doxorubicine chez les souris à l'aide des approches biochimiques. Les souris ont été soumises à un traitement oral de l'extrait aqueux de la plante *A. eremophilus* par les doses (100 et 200 mg/kg, pendant 10 jours) par voie orale et par une injection intrapéritonéale la doxorubicine (15 mg/kg). La toxicité a été évaluée par les dosages biochimiques (TGO, TGP, LDH et CPK), les activités antioxydants (GPx et MDA) et l'étude des coupes histologiques. Les taux du LDH, CPK, TGO, TGP et MDA ont enregistré une augmentation dans les groupes traités par la doxorubicine par rapport au groupe témoin, et diminution dans les groupes traités par l'extrait aqueux combiner avec la doxorubicine comparativement au groupe DOXO. Ces résultats ont été confirmés par les études histologiques. Ces résultats indiquent clairement que l'extrait aqueux de l'*A. eremophilus* joue un rôle protecteur important vis-à-vis la cardiotoxicité et hépatotoxicité provoquée un effet antioxydant.

Mots clé: Doxorubicine, cardiotoxicité, hépatotoxicité, *Astragalus eremophilus*, intrapéritonéale.

Summary:

Doxorubicin is an anti-cancer drug used for the treatment of many human malignancies. However, its clinical use is so limited due to its several side effects: cardiotoxicity and hepatotoxicity. In this study, we studied the preventive effect of *A. eremophilus* against oxidative stress, cardiotoxicity and hepatotoxicity induced by doxorubicin in mice using deferent biochemical approaches. The mice were subjected to oral treatment of the aqueous extract of the plant *A. eremophilus* by the doses (100 and 200 mg / kg, for 10 days) combined with an intraperitoneal injection of doxorubicin (15 mg / kg). Toxicity was assessed by biochemical assays (TGO, TGP, LDH and CPK), oxidative stress parametres (GPx and MDA) and the study of histological sections. The levels of LDH, CPK, TGO, TGP and MDA increased in the doxorubicin treated groups compared to the control group, and decreased in the aqueous extract treated groups combined with doxorubicin compared to the DOXO group. These results were confirmed by the histological studies. These results clearly indicate that the aqueous extract of *A. eremophilus* plays an important protective role against cardiotoxicity and hepatotoxicity by the antioxidant effect.

Key words: Doxorubicin, cardiotoxicity, hepatotoxicity, *Astragalus eremophilus*, intraperitoneal.