

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie physicochimique**  
**Filière : Sciences biologiques**  
**Option : Pharmacologie Moléculaire**



Rèf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

*Etude de l'effet oxydant des  
anticancéreux*

Présenté par :

**AMARI Katia & DJELLAL Tinhinane**

Soutenu le : **21/06/2017**

Devant le jury composé de :

Mr GHIDOUCHE. A	MCB	Président
Mme BENSALÉM-BOURNINE.S	MCB	Encadreur
Mme BOUDAOUUD-OUAHMED.H	MCB	Examinatrice

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# Remerciements

- *Au terme de ce modeste travail, on tient à remercier tout d'abord le dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour mener ce travail.*
- *Nous remercions pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire.*
- *Notre gratitude la plus profonde et nos remerciements les plus sincères à notre promotrice **M<sup>me</sup> Bensalem Sihem** pour son suivi, ses orientations, sa disponibilité au laboratoire, ses précieux conseils et ses remarques judicieuses.*
- *On tient à rendre notre profonde reconnaissance à **M<sup>r</sup> Bournin Lamine** pour son aide, sa précieuse attention, ses conseils et sa disponibilité au laboratoire.*
- *On remercie **M<sup>me</sup> SEBATHI** qui a accepté de remplacer notre promotrice pour son aide, ses conseils et sa présence pendant la finalité de ce travail.*
- *On remercie tous les membres de jury qui ont bien voulu accepter de lire ce travail et de l'évaluer.*
- *On tient à remercier infiniment nos très chères familles pour leur soutien et encouragement.*
- *Nos remerciements vont aussi vers le personnel du service oncologie de Tizi-Ouzou pour leurs chaleureux accueils et pour l'aide qu'ils nous ont fournis.*

## Dédicaces

*Je dédie Ce modeste travail:*

*Aux deux personnes que j'aime de tout mon cœur et qui m'ont toujours entouré, encouragé, motivé et qui me poussent à devenir meilleure:*

*Ma très chère*

*Mère, mon amie, ma confidente, celle qui a œuvré pour ma réussite et qui a été toujours là pour moi. Merci pour tous les sacrifices consentis et tes précieux conseils, pour ton assistance et ta présence dans ma vie ;*

*Mon très Cher*

*Père, mon guide, mon collègue, il est ma source d'encouragement. Merci pour ses valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi ;*

*À ma très Chère*

*et unique sœur, ma meilleure amie, celle avec laquelle je partage tous et qui me toujours aide D Y H J A ;*

*À mon très Cher*

*et unique frère Y O U V A que j'aime beaucoup ;*

*À toute ma famille*

*pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire ;*

*À ma très Chère*

*binôme, ma meilleure amie K A I J A ;*

*À toutes les*

*personnes qui m'ont aidé, soutenue et qui n'ont cessé de m'encourager ;*

*Une mention spéciale pour mes amis que j'aime.*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

*À mes chers et tendres parents, ceux qui avant tout m'ont donné naissance, m'ont guidé dans ma vie, dans mes études, ceux qui m'ont donné le courage, l'espoir, l'amour, la force. Des parents dont je suis fière de les avoir à mes côtés.*

*À ma chère sœur : Sarah qui m'as aidé dans ce travail.*

*À mon petit frère que je chéris tant Belaid*

*À mes chères tantes et oncles : Fariza, Saliha, Chahra, Said,  
Mohand, Brahim, Kamel.*

*À mes cousines et cousins*

*À tous mes amis*

*À mon binôme Tinhinane, ma fidèle amie avec qui j'ai réalisé ce dur travail.*

*À toutes les personnes qui m'ont aidé de loin ou de près à réaliser ce travail.*

*Katia*

# Sommaire

## Listes des tableaux

## Liste des figures

## Liste des abreviations

Introduction.....	1
-------------------	---

## Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Généralités sur le cancer.....	2
I.1.1. Définition du cancer : .....	2
I.1.2. Traitement .....	2
I.1.2.1. La chirurgie.....	2
I.1.2.2. La radiothérapie .....	2
I.1.2.3. Traitement médicamenteux.....	3
I.1.3. Les médicaments anticancéreux .....	3
I.1.3.1. Les différentes classes d'anticancéreux et leurs mécanismes d'action.....	3
I.1.3.2. Toxicité des anticancéreux.....	5
I.2. Le stress oxydatif.....	6
I.2.1. Généralité .....	6
I.2.2. Mécanisme de production des espèces réactives oxygénées (ERO) .....	6
I.2.2.1. Origine endogène des ERO.....	7
I.2.2.2. Origine exogène des ERO.....	8
I.2.3. Les cibles moléculaires des ERO .....	8
I.2.3.1. Oxydation des lipides.....	8
I.2.3.2. Oxydation des protéines.....	8
I.2.3.3. Oxydation de l'ADN.....	9
I.3. Chimiothérapie et stress oxydant .....	9
I.3.1. Statut oxydant marqueur biochimique chez les cancéreux .....	9
I.3.1.1. Evaluation du système antioxydant .....	10

I.3.1.2. La mesure des éléments trace .....	10
I.3.1.3. La mesure des produits d'oxydation .....	10
I.3.1.4. La mesure des ERO .....	11
I.3.2. Les anticancéreux et leurs potentiels cytotoxique et oxydant .....	11
I.3.3. L'anémie chimio-induite .....	12

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1. Matériels .....	14
II.1.1. Appareils utilisés .....	14
II.1.2. Produits chimiques .....	14
II.1.3. Présentation des agents chimiothérapeutiques utilisés .....	14
II.2. Méthodes : .....	15
II.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire .....	15
II.2.2. Préparation des solutions d'anticancéreux .....	15
II.2.3. Mode opératoire .....	16
II.2.3.1. Mesure de l'effet hémolytique des anticancéreux .....	16
II.2.4. Analyse statistique .....	18

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Etude de l'effet oxydant des anticancéreux sur les globules rouges .....	19
III.2. Effet des anticancéreux sur les lipides membranaires .....	22
III.3. Effet des anticancéreux sur l'hémoglobine .....	24
Conclusion .....	26
<b>Références bibliographiques</b> .....	27
<b>Annexe</b> .....	40

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les agents utilisés en chimiothérapie et leurs mécanismes d'action .....	<b>4</b>
<b>Tableau II</b> : les espèces réactives de l'oxygène ( <i>ERO</i> ) .....	<b>6</b>
<b>Tableau III</b> : les concentrations utilisées pour chaque anticancéreux.....	<b>15</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Production des ERO mitochondriale .....	<b>7</b>
<b>Figure 2 :</b> Taux d'hémolyse (%) des globules rouges traités par différents agents de chimiothérapie:.....	<b>19</b>
<b>Figure 3:</b> Concentration des globules rouges après traitement avec les différentes molécules anticancéreuses.....	<b>20</b>
<b>Figure 4 :</b> Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec les différents agents de chimiothérapie. ....	<b>21</b>
<b>Figure 5 :</b> Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec les différents agents de chimiothérapie. ....	<b>21</b>
<b>Figure 6 :</b> Teneur en MDA des globules rouges traités par différents agents de chimiothérapie. ....	<b>22</b>
<b>Figure 7 :</b> Photographie du témoin (-) et du taxotère (TAX). . .	<b>24</b>
<b>Figure 8 :</b> Evaluation de l'effet des différents agents de chimiothérapie sur l'oxydation de l'hémoglobine. ....	<b>24</b>



## Liste des abréviations

**AAPH** : 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ADNmt** : Acide désoxyribonucléique mitochondrial.

**ADNn** : Acide désoxyribonucléique nucléaire.

**CAR** : Carboplatine.

**CAT** : Catalase.

**CG** : Chromatographie gazeuse.

**CG-SM** : Chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse.

**CIS** : Cisplatine.

**CYC** : Cyclophosphamide.

**DNPH** : 2,4-Dinitrophénylhydrazine.

**EDTA** : Acide éthylène-diamine tétra acétique.

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.

**ERT** : Ertican.

**ETO** : Etoposide.

**FADH2** : Flavine adénine dinucléotide.

**FRAP** : Ferric reducing antioxidant power.

**GEM** : Gemcitabine.

**GPx** : Glutathion peroxydase.

**GR** : Globule rouge.

**Hb** : Hémoglobine.

**HO** : Holoxan.

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**MTX** : Méthotrexate.

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide.

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**ORAC** : Oxygen radical absorbance capacity assay.

**ORL** : Oto-rhino-laryngologie.

**OXA** : Oxaliplatine.

**P.C** : Protéines carbonyles.

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**TAX** : Taxotère.

**TBA** : Acide thiobarbiturique.

**TBARS** : Thiobarbiturique Reactive Substances.

**TBARP** : Thiobarbiturique Reactive Product.

**TCA** : Acide trichloracétique.

**TRAP** : Total radical-trapping antioxidant parameter.

**8-OHdG** : 8-Oxo-2'-désoxyguanosine ou 8-hydroxydésoxyguanosine.

# INTRODUCTION

### Introduction

Le cancer représente un problème majeur de santé publique. Il constitue une des principales causes de mortalité dans le monde.

La cancérogenèse, qui est l'ensemble des phénomènes ou d'événements qui conduisent à la transformation d'un tissu sain en tissu cancéreux (**Hamidi, 2013**), est composée de trois étapes, à savoir une initiation, une promotion et une progression (**Paris et al, 2016**). Chaque étape implique des altérations géniques qui affectent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (**Tubiane et al, 2008 ; Link et al, 2010**).

La chimiothérapie est une stratégie qui cherche à inverser ou à supprimer le processus de cancérogenèse dans le but d'éliminer les cellules cancéreuses par l'emploi de divers médicaments anticancéreux applicables seul ou en combinaison (**Johnson et al, 2009**). Même si les traitements chimiothérapeutiques ont largement contribué à l'amélioration de la survie de patients atteint d'un cancer, leurs toxicités envers les cellules normales à renouvellement rapide tel que les cellules de la moelle osseuse provoquent un grand nombre d'effets indésirables inévitables et qui peuvent être fatales pour l'organisme (**Delavigne, 2009**).

Les effets secondaires nocifs des agents chimiothérapeutiques comprennent la production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO). D'une autre part des études récentes tentent d'introduire les ERO comme mécanisme d'action de certains médicaments anticancéreux (**Barrera, 2012**).

Plusieurs études ont montré que la toxicité de la chimiothérapie anticancéreuse s'exprime par la génération des radicaux libres et la peroxydation des lipides membranaires ce qui peut provoquer une toxicité hématologique très sévère (**Batteux et al, 2014**).

Le globule rouge est une cellule, anucléée entourée d'une membrane cytoplasmique, dont le composant principal est l'hémoglobine. Pour cela, le globule rouge comme modèle cellulaire, représente un excellent système dans l'étude du stress oxydant en raison de sa particularité constitutionnelle et fonctionnelle.

Notre étude consiste à évaluer l'effet oxydant des anticancéreux sur les globules rouges par la mesure de la concentration cellulaire, l'évaluation du stress oxydant à travers le dosage des produits de la peroxydation lipidique et la mise en évidence de l'oxydation et la dénaturation de l'hémoglobine par les agents de chimiothérapie.

## I.1. Généralités sur le cancer

### I.1.1. Définition du cancer :

Le cancer est caractérisé par une multiplication et propagation incontrôlée de cellules anormales et une insensibilité à l'apoptose. Il est provoqué par des agents externes ou des facteurs génétiques héréditaires. Une cellule devient cancéreuse lorsque son système de réparation laisse échapper les différentes modifications microscopiques qui s'y sont accumulées. Cette cellule se prolifère rapidement et de façon incontrôlée formant ainsi une tumeur au niveau d'un organe. Ces cellules cancéreuses peuvent s'échapper et migrer vers d'autres tissus à travers les vaisseaux sanguins et lymphatiques formant des métastases (*Soulié et al, 2015 ; Mascoux ,2016*).

La cancérogénèse qui englobe l'ensemble des processus conduisant à la formation d'une tumeur peut être divisée en trois phases : l'initiation, la promotion et la progression tumorale (*Gérin et al, 2003 ; Tubiana, 2008 ; Paris et al, 2016*).

### I.1.2. Traitement

La prise en charge thérapeutique du patient atteint d'un cancer est multidisciplinaire. Elle fait appel à différentes spécialités dont les plus connus sont : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Elle vise à éliminer la tumeur cancéreuse et de prévenir l'apparition de métastase ou d'autres cancers (*Landi et al, 2004 ; Benoist, 2007 ; Psimaras et al, 2010 ; Soulié et al, 2015 ; Yang et al 2016*).

#### I.1.2.1. La chirurgie

Cette technique consiste à intervenir directement au niveau de la tumeur ; c'est-à-dire : ablation de la tumeur soit de façon partielle soit totalement. Généralement c'est un traitement principal et efficace lorsque la tumeur est localisée (*Delavigne, 2009 ; Soulié et al, 2015*).

#### I.1.2.2. La radiothérapie

C'est une méthode de traitement fondée sur l'action biologique des rayonnements ionisants et plus spécialement les rayons X à haute énergie pour la thérapie du cancer, elle vise l'altération des capacités de prolifération des cellules cancéreuses en les exposant à des doses élevées de radiation tout en préservant le plus possible les tissus sains et les organes avoisinants. Elle peut être proposée comme seul traitement ou bien en association avec la chimiothérapie (*Stea et al, 2011*).

### I.1.2.3. Traitement médicamenteux

La chimiothérapie anticancéreuse vise à détruire les cellules en division. C'est un traitement qui repose sur la prise d'une substance chimique ayant pour cible d'agir sur la cellule tumorale en ralentissant sa multiplication à fin d'augmenter l'espérance de vie du patient et de réduire les douleurs dû aux métastases (*Regnier-Denois et al, 2009 ; Faure et al, 2010*)

### I.1.3. Les médicaments anticancéreux

Les agents anticancéreux sont des médicaments utilisés seuls ou en association dans les chimiothérapies qui composent le traitement des cancers. Ils visent à lutter contre la prolifération anarchique de cellules qui se différencient des cellules normales par la présence d'anomalies génétiques et fonctionnelles. Cette chimiothérapie n'a pas pour but de détruire la tumeur localement mais d'éviter l'échappement tumoral secondaire à la formation de métastases à distance (*Apretna et al 2004 ; Delavigne, 2009 ; Zhang et al, 2010*).

#### I.1.3.1. Les différentes classes d'anticancéreux et leurs mécanismes d'action

Ces molécules ont été classées en fonction de leurs mécanismes pharmacologiques en trois catégories :

- ❖ Anticancéreux Cytotoxiques : Les agents utilisés en chimiothérapie cytotoxique diffèrent par leurs modes d'action et leurs appartenances à des familles chimiques. On distingue ainsi six grandes familles: les agents alkylants, les inhibiteurs de la topoisomérase I et II, les poisons du microtubule (Agents intercalants), les antimétabolites et les agents scindants (*Merceron et al, 2006*).

**Tableaux I:** Les agents utilisés en chimiothérapie et leurs mécanismes d'action (*Merceron et al, 2006 ; Faure et al, 2010 ; Zhang et al, 2010 ; Burotto et al, 2015*).

<b>Classe des anticancéreux :</b>	<b>Exemples d'anticancéreux :</b>	<b>Mécanisme d'action :</b>
Les agents alkylants	Cyclophosphamide Ifosfamide Chlorambucil Melphalan Mitomycine Sels de platine (cisplatine, carboplatine et oxaliplatine)	Sont des composés possédant un ou plusieurs groupement alkyle très nucléophiles pouvant entrer en interaction avec l'ADN pour créer des lésions covalentes qui vont avoir pour conséquence l'inhibition de sa transcription et sa réplication. Par ailleurs, ils sont responsables de la libération de radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN.
Les poisons du microtubule (Agents intercalants)	Alcaloïdes de la pervenche (vincristine, vinblastine, vinorelbine) Taxanes (paclitaxel, docétaxel)	Sont des molécules caractérisées par plusieurs noyaux aromatiques condensés. Elles provoquent une détorsion de la molécule d'ADN, ce qui empêche la progression des ARN et ADN polymérase et inhibe donc la réplication et la transcription. Elles induisent également la génération de radicaux libres.
Les antimétabolites	Antipirimidiques (5 fluorouracile, gemcitabine, cytarabine) Antifoliques (méthotrexate).	Sont des analogues structuraux des bases puriques, pyrimidiques et des coenzymes foliniques. Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques en provoquant une carence en nucléotides.
Les agents scindants	Bléomycine	Ils possèdent une structure moléculaire qui leur permet de s'insérer entre les composants de

		l'ADN réalisant ainsi de multiples cassures de cette molécule.
Les inhibiteurs de la topoisomérase I	Dérivés de la camptothécine: irinotécan et topotécan	Les topoisomérases sont des enzymes intervenant dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN en réalisant des coupures mono ou double brin. Par l'inhibition de ces enzymes on prive la cellule d'utiliser ses informations génétiques et donc on provoque sa mort.
Les inhibiteurs de la topoisomérase II	Anthracyclines (adriamycine, étoposide)	

- ❖ Thérapies ciblées : il s'agit des médicaments dont l'action est ciblée à un niveau précis du fonctionnement ou du développement des cellules tumorales. On distingue deux types : des médicaments à action extra cellulaire : sont dirigés contre un récepteur membranaire qui est présent sur la cellule tumorale (tel que : avastin, erbitux...), et des médicaments à action intra cellulaires : inhibent la transmission du signal de prolifération cellulaire par l'inhibition enzymatiques (tel que : multikinases, glivec...) (*Merlin 2008 ; Psimaras et al 2010*).
- ❖ Autres anticancéreux : il s'agit d'agents anticancéreux ayant des modes d'action différents des deux groupes ci-dessus (*Psimaras et al, 2010*).

### I.1.3.2. Toxicité des anticancéreux

Les différents médicaments utilisés dans les protocoles de chimiothérapie n'agissent pas spécifiquement sur les cellules tumorales mais peuvent aussi être toxiques pour les cellules saines surtout celles à prolifération rapide (*Delavigne, 2009*). Ces effets toxiques peuvent être cités comme suit : cardiotoxicité, neurotoxicité, néphrotoxicité, hépatotoxicité, alopecie, déshydratation, fatigue, stérilité, dénutrition, problèmes cutanés, allergies et bien d'autres (*Tacar et al, 2012 ; Yang et al 2016 ; Mason et al, 2016*).



## I.2. Le stress oxydatif

### I.2.1. Généralité

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est considéré comme un déséquilibre et une défaillance des systèmes antioxydants protégeant les constituants de l'organisme d'une oxydation ou d'une agression induite par un excès de molécules relativement nocives appelées radicaux libres (*Valko et al, 2007 ; Lushchak et al, 2014*). Ces radicaux libres sont définis comme étant des espèces chimiques réactives possédant un électron non apparié sur l'orbital externe qui leur confère une instabilité. Cette configuration procure de l'énergie à ces radicaux qui peuvent ainsi interagir avec d'autres molécules notamment ; les protéines, les lipides, l'acide nucléique. Parmi les différentes classes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont les plus abondantes (*Haleng et al, 2007 ; Costa et al, 2014 ; Batteux et al, 2014 ; Sies et al 2017*).

Les dérivés de l'oxygène qui constitue cette classe sont représentés dans le Tableau II.

**Tableau II :** les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (*Phaniendra et al, 2014 ; Lushchak et al, 2014 ; Sies et al 2017*).

Nom du radical	Formule
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^-$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Radical hydroxyle	$\text{OH}^-$
Alcoxyles	$\text{RO}^-$
Radical peroxyde	$\text{ROO}^-$
hydroperoxydes	$\text{ROOH}$
Oxydes nitriques	$\text{NO}^-$

### I.2.2. Mécanisme de production des espèces réactives oxygénées (ERO)

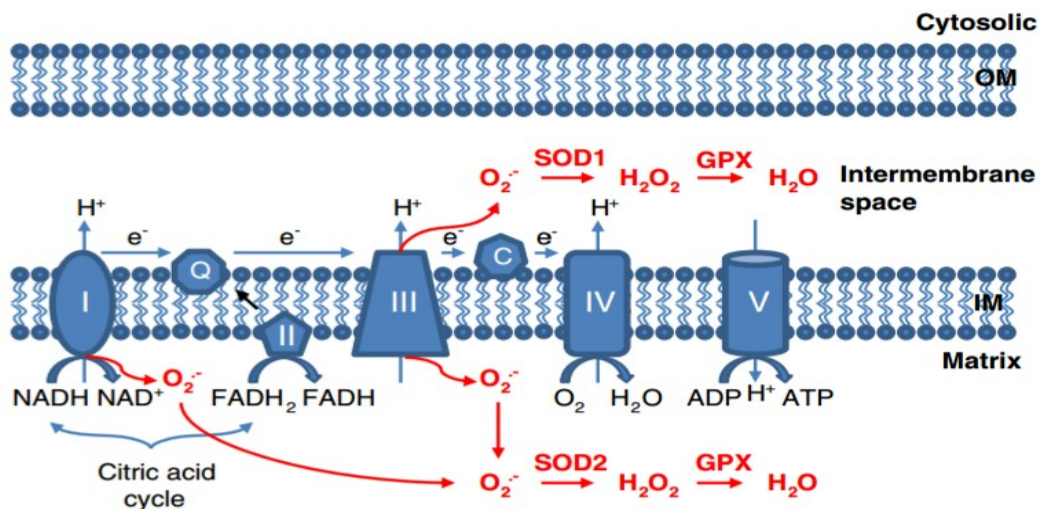
La production des radicaux libres consiste principalement à la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, mais aussi l'élimination ou l'addition d'un électron. Ces espèces réactives oxygénées sont générées par différents mécanismes divisés généralement en deux classes : endogène et exogène (*Franco et al, 2008 ; Costa et al, 2014 ; Lushchak et al, 2014 ; Sies et al 2017*).

## I.2.2.1. Origine endogène des ERO

## 1) La mitochondrie

La mitochondrie est la source majoritaire de production de radicaux libres, principalement l'anion superoxyde et ce à travers la chaîne respiratoire. Cette production débute lorsque les composés NADH et FADH<sub>2</sub> sont oxydés libérant ainsi de l'hydrogène et des électrons qui sont transportés le long de cette chaîne conduisant à une réduction de l'oxygène en H<sub>2</sub>O. Il arrive qu'il y est des fuites de certains électrons amenant à former l'anion superoxyde qui sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) est dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Li *et al*, 2013 ; Zorov *et al*, 2014 ; Costa *et al*, 2014 ; Jitschin *et al*, 2014 ; Lushchak *et al*, 2014).

D'autres enzymes mitochondriales sont aussi impliquées dans la génération des ERO, tels que : la NADPH oxydase, la monoamine oxydase,  $\alpha$ -Glycérophosphate déshydrogénase (Zorov *et al*, 2014 ; Costa *et al*, 2014 ; Sies *et al* 2017). Ce mécanisme de production des ERO est résumé dans la figure 1.



**Figure 1** : Production des ERO mitochondriale (Li *et al*, 2013).

## 2) L'inflammation

L'inflammation est un processus permettant aussi la production d'ERO qui est stimulé par la présence d'agents pathogènes dans l'organisme conduisant à l'activation d'une enzyme située dans la membrane plasmique des phagocytes appelée NADPH oxydase qui peut utiliser l'oxygène moléculaire pour former

d'importantes quantités d'anions superoxydes (*Favier, 2003 ; Beevi et al, 2007 ; Winterbourn, 2008 ; Costa et al, 2014*).

### 3) Le peroxysome

Les peroxysomes du foie sont les plus importants de l'organisme avec une production importante d' $H_2O_2$  résultante essentiellement d'une oxydation peroxysomale des acides gras (*Valko et al, 2006 ; Franco et al, 2008 ; Phaniendra et al 2014 ; Costa et al, 2014*).

#### I.2.2.2. Origine exogène des ERO

Des facteurs externes liés à l'environnement et au mode de vie sont également à l'origine de l'accumulation des radicaux libres dans l'organisme tels que des agents environnementaux pro-oxydants, intoxication aux métaux lourds, la pollution, les rayonnements ionisants et ultra violets, carence en antioxydants apporté par l'alimentation ou résultante d'une anomalie génétique, métabolisme de certains xénobiotiques et des pilules contraceptives, consommation d'alcool, de tabac et d'aliments industriels (*Defraigne et al, 2008 ; Winterbourn, 2008*).

#### I.2.3. Les cibles moléculaires des ERO

L'accumulation des ERO dans les cellules contribue à l'oxydation de divers composants, y compris les acides nucléiques, les protéines et les lipides (*Costa et al, 2014 ; Lushchak et al, 2014*).

##### I.2.3.1. Oxydation des lipides

L'oxydation des lipides membranaires et cellulaires, appelé peroxydation lipidique est un phénomène qui abouti à la formation de déférents dérivés lipidiques par oxydation des acides gras polyinsaturés présents dans les phospholipides, engendrant des modifications de la fluidité et de la perméabilité des membranes, et un dysfonctionnement de nombreux récepteurs, enzymes et transporteurs membranaires (*Favier, 2003 ; Defraigne, 2008 ; Phaiendra, 2014 ; Sies et al 2017*).

##### I.2.3.2. Oxydation des protéines

Les ERO peuvent oxyder les acides aminés présents dans les protéines et généralement les acides aminés aromatiques entrainant leur modification, fragmentation de la chaine peptidique, agrégation de produits d'interaction protéines-ERO, modification des

charges électriques, perte des fonctions enzymatiques, modifications de la structure protéique, et des interactions protéine-protéine (*Sies et al 2017*).

#### I.2.3.3. Oxydation de l'ADN

Les ERO interagissent avec le désoxyribose de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. L'ADN mitochondriale (ADN mt) est plus exposé à cette oxydation que l'ADN nucléaire (ADNn) du fait qu'il est à proximité de la chaîne respiratoire mitochondriale génératrice des ERO avec 2 à 3 fois plus de bases oxydées au niveau de l'ADNmt qu'au niveau de l'ADNn. Cette interaction induit des cassures mono et double brin de l'ADN, des modifications des bases, des interactions protéines-ADN, des altérations génétiques, et des mutations conduisant à l'apparition de cancer (*Phaniendra, 2014 ; Kumar et al, 2014 ; Sies et al 2017*).

### I.3. Chimiothérapie et stress oxydant

Le stress oxydatif qui est caractérisé par une concentration élevée de radicaux libres provoquant divers dommages cellulaires, est impliqué dans un grand nombre de maladies, agissant comme facteur déclenchant ou compliquant l'évolution de la maladie. Le stress oxydatif est de ce fait impliqué dans la promotion du cancer en activant des pro-carcinogène, en induisant des dommages de l'ADN et en inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme la p53 (*Favier, 2003 ; Rizwan et al, 2008 ; Leufkens et al, 2011*). Le stress oxydatif peut aussi avoir un effet suppresseur sur les tumeurs car les cellules tumorales sont plus sensibles aux agents qui produisent des ERO que les cellules normales. D'une autre part certains de ces médicaments induisent à leurs tours un stress oxydant responsable de leurs effets secondaires et de la chimiorésistance.

(*Gorrini et al, 2013 ; Allen et al, 2013 ; Batteux et al, 2014*).

#### I.3.1. Statut oxydant marqueur biochimique chez les cancéreux

Dans le but d'étudier le statut oxydant chez les cancéreux plusieurs méthodes ont été mises au point se basant sur la mesure de certains paramètres, notamment : la détermination des antioxydants, la mesure des produits d'oxydation, la mesure des éléments traces et l'identification intracellulaires des ERO (*Kong et al, 2014 ; Stinkens et al, 2015 ; Sies et al, 2017*). Ces paramètres, appelés biomarqueurs du stress oxydatif peuvent être résumés comme suit :

### I.3.1.1. Evaluation du système antioxydant

Cette évaluation passe par la mesure des antioxydants enzymatiques, non enzymatiques et la capacité antioxydante totale.

#### a) Les antioxydants de bas poids moléculaires dit non enzymatiques

Cette étude est basée sur la détermination des concentrations des antioxydants non enzymatiques tels que : la vitamine E, la vitamine C, les B carotènes, la coenzyme Q10 dans les tissus et les liquides corporelles, réalisée généralement par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou chromatographie gazeuse (CG) (*Dotan, et al 2004 ; Yossepowitch et al, 2007 ; Kong et al, 2013*).

#### b) Les antioxydants enzymatiques

Cette étude consiste en l'évaluation de l'activité et du niveau enzymatique généralement de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPx) au moyen d'une analyse spectrophotométrique ou autres (*Beevi et al, 2007 ; Majsterek et al, 2011 ; Battisti et al, 2011 ; Victorino et al, 2013*).

#### c) La capacité antioxydante totale

C'est la mesure de l'effet inhibiteur de tous les antioxydants présents dans le plasma et les liquides corporelles, passant par la mesure du TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) (*Panis et al, 2011 ; Victorino et al, 2013*), l'ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay) ainsi que le FRAP (ferric reducing antioxidant power) (*Leufkens et al, 2011*), utilisant comme méthode la spectrophotométrie et le kit ELISA (*Dotan et al 2004 ; Haleng et al, 2007*).

### I.3.1.2. La mesure des éléments trace

Le zinc et le cuivre cofacteur de la SOD et le sélénium cofacteur de la GPx peuvent être utilisés comme biomarqueurs du stress oxydatif en utilisant la spectroscopie de masse à plasma (*Pincemail et al, 2009 ; Stinkens et al, 2015*).

### I.3.1.3. La mesure des produits d'oxydation

#### a) Mesure des protéines oxydées

Les protéines carbonyles (P.C) dérivées de l'oxydation des protéines par les ERO, sont considérées comme un marqueur du stress oxydatif (*C.Panis et al, 2011*).

La spectrophotométrie ou la technique HPLC est utilisée pour mettre en évidence la protéine hydrazone produite après interaction des P.C avec le dinitrophénylhydrazine (DNPH) (*Battisti et al, 2011 ; Victorino et al, 2013*).

b) Mesure des lipides oxydés

La malondialdéhyde (MDA) est le marqueur de l'oxydation lipidique le plus utilisées, en utilisant le test TBARS (ThioBarbituric Reactive Substances) qui met en évidence par colorimétrie la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec les MDA (*Yossepowitch et al, 2007 ; Panis et al, 2011 ; Battisti et al, 2011 ; Pande et al, 2012 ; Jitschin et al, 2013 ; Victorino et al, 2013 ; Ayala et al, 2014 ; Collard 2014 ; Lushchak et al, 2014*).

c) Mesure de l'ADN oxydé

La 8-Oxo-2'-désoxyguanosine ou 8-hydroxydésoxyguanosine (8.OHdG), qui résulte de l'oxydation de l'ADN est l'un des marqueurs le plus utilisé. Sa mesure se fait par HPLC ou chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CG-SM) ou encore par ELISA (*Collins, 2004 ; Haleng et al, 2007 ; Jitschin et al, 2013 ; Collard 2014*).

Le test de Comète est aussi une méthode permettant l'évaluation de l'ADN oxydé en mesurant les cassures dans l'ADN des cellules, généralement les lymphocytes (*Sies et al, 2017*). Au moyen de l'électrophorèse, l'ADN possédant des cassures se déplace formant une comète (*Pincemail et al, 2009 ; Majsterek et al, 2011*).

I.3.1.4. La mesure des ERO

Les méthodes utilisées pour la mesure des ERO intracellulaire dépendent du type d'ERO à détecter. La spectroscopie et microscopie fluorescente, la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique et la spectrophotométrie sont les plus utilisées (*Costa et al, 2014 ; Stinkens et al, 2015*).

**I.3.2. Les anticancéreux et leurs potentiels cytotoxique et oxydant**

Il est à noter que certain agents chimiothérapeutiques sont à l'origine de la production des ERO durant le traitement du cancer. Cette production des ERO dépend du médicament lui-même ; certain génèrent plus de ERO que d'autre notamment les anthracyclines et les dérivés de platine (*Qin et al, 2008*).

La génération du stress oxydant par la chimiothérapie est soit due à la perturbation de la mitochondrie (*Martins et al, 2008 ; Gorrini, 2013 ; Stinkens et al, 2015*), de la NADPH oxydase, ou de la cytochrome P450 du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques qui à l'origine d'une importante production des ERO due au métabolisme de ces agents chimiothérapeutiques (*Ozben, 2007*), ou bien dû à la perturbation ou à la diminution des capacités du système antioxydant (*Gorrini et al, 2013*).

Le stress oxydatif est aussi un mécanisme d'action de certains médicaments anticancéreux mais à très hautes doses, les cellules saines peuvent être attaquées par ce stress provoquant l'altération des lipides, altérations des enzymes et des protéines conduisant à une apoptose cellulaire (*Barrera, 2012*).

Ce stress oxydatif induit par la chimiothérapie est à l'origine de la majorité de leurs effets indésirables, et peut conduire au développement d'une chimiorésistance ceci via l'induction de mutation par des dommages d'ADN causés par les radicaux libres (*Gorrini et al, 2013*).

### **I.3.3. L'anémie chimio-induite**

L'anémie est définie selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme une diminution du taux de l'hémoglobine (Hb) en dessous des valeurs limites considérées comme normales et fixées en fonction de l'âge, du sexe et d'un état physiologique particulier. On parle d'anémie lorsque le taux d'Hb est inférieur à 13 g/dl chez l'homme, et à 12g/dl chez la femme (*Essomba et al, 2015*).

L'anémie chimio-induite est une complication hématologique secondaire uniquement à l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques dans le cas d'un cancer, avec un taux d'hémoglobine < 12g/dl, souvent associée à une diminution des globules rouges (GR) et de l'hématocrite (*Iuchi, 2012 ; Tiotiu et al, 2015*).

Son étiologie est multifactorielle, certains médicaments chimiothérapeutiques induisent l'anémie par perturbation de la production ou la libération de l'érythropoïétine, hormone sécrétée majoritairement par le rein ; responsable de la synthèse des globules rouges. D'où leur diminution ainsi que celle du taux d'hémoglobine (*David, 2009 ; Tiotiu et al, 2015*).

D'autres induisent une anémie par carences en folates comme le méthotrexate, mais la majorité des anticancéreux cytotoxiques agissent par blocage de la division cellulaire, de ce fait, les érythroblastes qui nécessitent une division cellulaire rapide et intense pour donner des globules rouges, peuvent être attaqués par ces agents et conduire à une anémie par

inhibition ou diminution de leur synthèses (*David, 2009*). Certains médicaments induisent une anémie hémolytique par action directe sur les globules rouges souvent appelée stomatocytose comme c'est le cas avec l'isofosfamide (*David, 2009*).



## II.1. Matériels

### II.1.1. Appareils utilisés

- Spectrophotomètre à UV.
- Balance analytique.
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Bain mari.
- Réfrigérateur.
- Agitateur électromagnétique.

### II.1.2. Produits chimiques

- Chlorure de sodium (NaCl).
- 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH).
- Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Hydroxyde de sodium (NaOH).
- Acide thiobarbiturique (TBA).
- Acide trichloracétique (TCA).
- Acide éthylène-diamine tétra acétique (EDTA).

### II.1.3. Présentation des agents chimiothérapeutiques utilisés

Les différents agents anticancéreux utilisés, ont été tous rapportés au niveau du CHU « Nedir Mohamed » de la wilaya de Tizi-Ouzou unité « BELLOUA ».

Les différents médicaments anticancéreux utilisés sont les suivant :

Holoxan, Cyclophosphamide, Etoposide, Carboplatine, Gemcitabine, Cisplatine, Oxaliplatine, Taxotère, Epirubicine, Erinotécan, Methotrécate (*Annexe*).

## II.2. Méthodes :

### II.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Dans ce test, on a utilisé les globules rouges (GR) de l'être humain comme modèle cellulaire. Le sang est collecté chez des sujets sains dans des tubes EDTA et conservé au frais à 4°C. Il est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min à 4 °C puis lavé trois fois avec une solution isotonique. Les plaquettes, les leucocytes et le plasma sont soigneusement éliminés par pipetage. La suspension érythrocytaire est préparée avec une hématocrite égal à 10 %.

### II.2.2. Préparation des solutions d'anticancéreux

Les solutions d'anticancéreux testés sont préparées dans la solution isotonique à des concentrations désirées pour le test. Les concentrations utilisées pour chaque molécule sont dans le tableau suivant :

**Tableau III** : les concentrations utilisées pour chaque anticancéreux.

<b>La molécule</b>	<b>La concentration utilisée</b>
Holoxan (HO)	(30 mg/ml)
Cyclophosphamide (CYC)	(1 mg/ml)
Cisplatine (CIS)	(1 mg/ml)
Carboplatine (CAR)	(1.35 mg/ml)
Oxaliplatine (OXA)	(2 mg/ml)
Pirucin (PIR)	(0.7 mg/ml)
Taxotère (TAX)	(0.65 mg/ml)
Gemcitabine (GEM)	(8 mg/ml)
Etoposide (ETO)	(0.4 mg/ml)
Méthotrexate (MTX)	(2 mg/ml)
Ertican (ERT)	(2 mg/ml)

### II.2.3. Mode opératoire

#### II.2.3.1. Mesure de l'effet hémolytique des anticancéreux

Dans cette partie du travail, nous avons utilisé des GR humains comme modèle cellulaire et le radical AAPH comme témoin positif pour étudier l'effet cytotoxique des anticancéreux. L'intégrité membranaire a été mesurée par dosage de l'Hb libérée (concentration de l'Hb extracellulaire), mesure de la concentration cellulaire à travers la détermination de la turbidité et la protection intracytoplasmique par le dosage de l'Hb intracellulaire (concentration de l'Hb intracellulaire).

#### a) Détermination de l'hémolyse érythrocytaire

L'activité hémolytique des anticancéreux a été déterminée par la mesure du taux d'hémolyse des érythrocytes. Pour cela, une gamme d'agents de chimiothérapie a été utilisée afin de sélectionner les molécules à effet cytotoxique en utilisant en parallèle un témoin positif qui est le AAPH.

Brièvement, un volume de la suspension érythrocytaire est mélangé avec l'échantillon ou bien de la solution isotonique. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 2 heures (h). Après incubation, un volume du mélange est prélevé puis dilué avec de la solution isotonique ou de l'eau distillée pour le témoin positif. L'absorbance est mesurée à 620 nm, puis les absorbances des surnageant ont été mesurée à 412 et 540 nm. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé selon l'équation suivante.

$$\% \text{ d'hémolyse} = (A_E/A_{TP}) \times 100$$

$A_E$  : absorbance de l'échantillon ;  
 $A_{TP}$  : absorbance du témoin positif.

#### b) Test de peroxydation lipidique

Les lipides, principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. *In vivo*, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines. La lipoperoxydation des membranes va altérer leurs fonctionnalités (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...).

Parmi les produits d'oxydation des lipides, on a les malonalaldéhydes (MDA) comme produits secondaires d'oxydation. Le dosage des MDA a été réalisé il y a plus d'une cinquantaine d'années et constitue sans doute le marqueur de peroxydation lipidique le plus utilisé (*Favier, 2003*). Ce dosage est réalisé le plus souvent par condensation en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. Toutefois, la spécificité du dosage des MDA reste discutée car son dosage nécessite des précautions particulières (utilisation d'une eau très pure, ajout de desferrioxamine) pour éviter la génération de MDA à partir des lipides au cours du dosage. Un autre inconvénient est que le dosage des MDA, produit de réaction terminal de la peroxydation lipidique, exclut tous les produits des réactions intermédiaires entre le début de la peroxydation et la formation de cet aldéhyde. Par conséquent les concentrations de MDA pourraient ne pas refléter l'ampleur de la peroxydation lipidique (*Halliwel & Chirico, 1993*).

#### ❖ Dosage des TBARS

L'évaluation de la peroxydation lipidique par la détermination des TBARS formés dans les membranes des globules rouges a été réalisée selon la méthode de (*Sivonova et al, 2004*). Une suspension d'hématies est déprotéinisée par l'ajout de 0,5 ml de TCA (30%), puis incubée à 0 °C pendant 120min, suivie d'une centrifugation (3000 rpm pendant 10 min à 4 °C). Un volume du surnageant a été mélangé avec un volume de TBA à 1% et d'EDTA (0,1mol/l) puis le mélange a été chauffé à 95 °C pendant 15min suivi d'un refroidissement. L'absorbance du produit coloré (TBARP) a été mesurée à 535 nm.

#### c) Mesure de l'oxydation de d'hémoglobine :

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules anticancéreuses sur l'oxydation des globules rouges nous avons évalué l'effet de ces molécules sur l'oxydation de l'hémoglobine. Le protocole expérimentale développé selon la méthode d'écrite par (*Bellik et al, 2013*).

L'hémoglobine est répartie en différents groupes. Chaque échantillon est d'abord pré-incubé avec du NaCl à 0.9% (pour les échantillons témoins) ou les molécules anticancéreuses et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 mM (pour le témoin positif) pendant 30 min à 37 °C, à l'exception du témoin négatif qui est traité par une solution isotonique (NaCl à 0.9%). L'absorbance a été ensuite mesurée par spectrophotomètre à 412 nm.

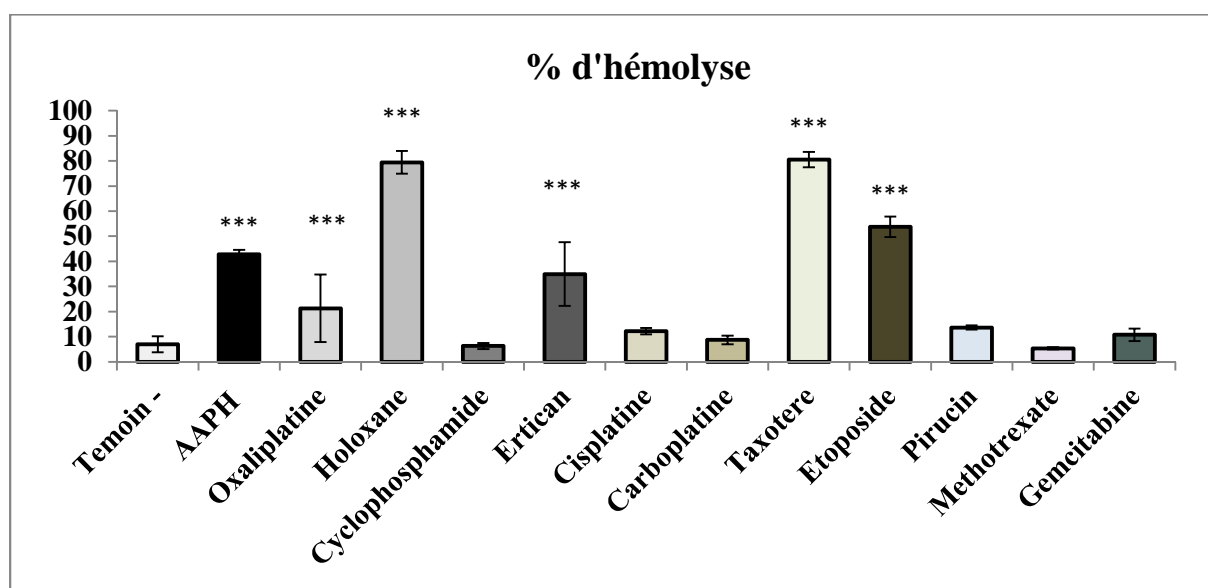
**II.2.4. Analyse statistique :**

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Graph Pad Prism 5, les résultats sont présentés comme moyenne  $\pm$  déviation standard (SD) et sont évalués avec ANOVA à une seule variable, avec le test Bonferroni post-hoc. Le seuil de signification est fixé à  $p < 0,05$ .

La production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est fortement impliquée dans les mécanismes de toxicité des médicaments utilisés en chimiothérapie et donc dans la génération de leurs effets secondaires. Parmi ces derniers l'anémie qui est fréquemment rencontrée après les cures de chimiothérapie et qui reste un problème majeur de santé pour le patient à cause de son intolérance aux traitements. Dans le présent travail, nous avons étudié l'effet de certains médicaments anticancéreux sur les érythrocytes du sang ; dans l'objectif de démontrer leurs toxicités membranaires (agissent directement sur les globules rouges « GR ») induisant ainsi une anémie appelée anémie chimio-induite.

Nous avons opté dans notre démarche à l'utilisation des GR du fait qu'elles sont dépourvues de noyaux facilitant ainsi des conclusions sur l'action des anticancéreux sur les membranes cellulaires. Pour cela, l'effet oxydant des anticancéreux a été déterminé par la mesure du pourcentage d'hémolyse des érythrocytes. L'intégrité de la membrane a été mesurée par le dosage de l'hémoglobine libérée, mesure de la turbidité cellulaire, et dosage de l'hémoglobine intracellulaire.

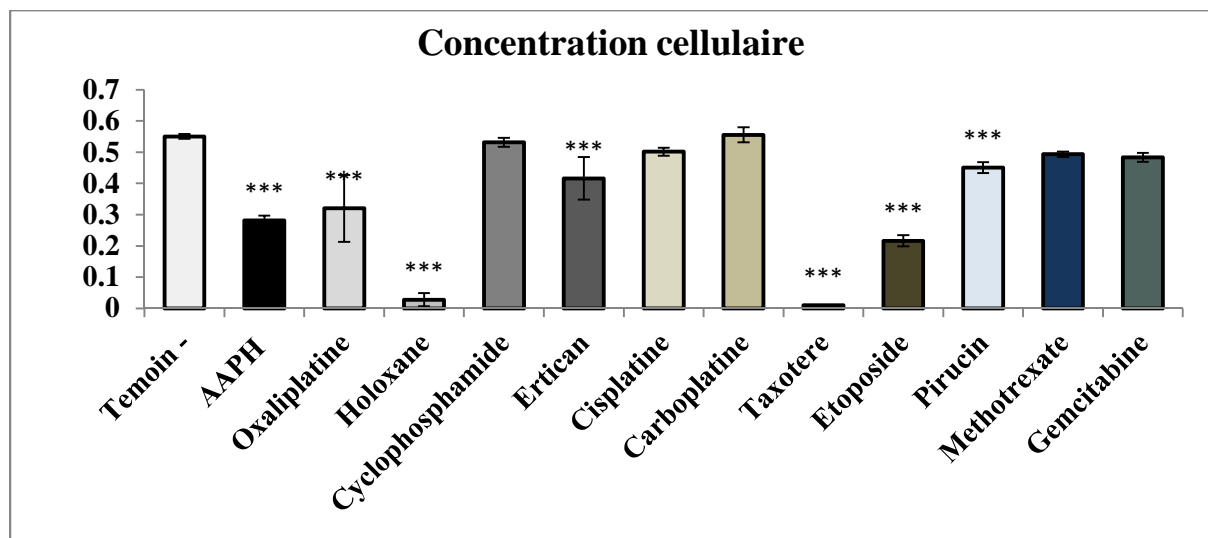
### III.1. Etude de l'effet oxydant des anticancéreux sur les globules rouges



**Figure 2 :** Taux d'hémolyse (%) des globules rouges traités par différents agents de chimiothérapie: Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0,9% ; témoin positif : AAPH. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD de trois différentes expérimentations ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparé avec le contrôle négatif.

Les résultats de l'effet hémolytique des molécules anticancéreuses montrent que l'étoposide, l'holoxan et le taxotère présentent un potentiel effet hémolytique des GR avec un

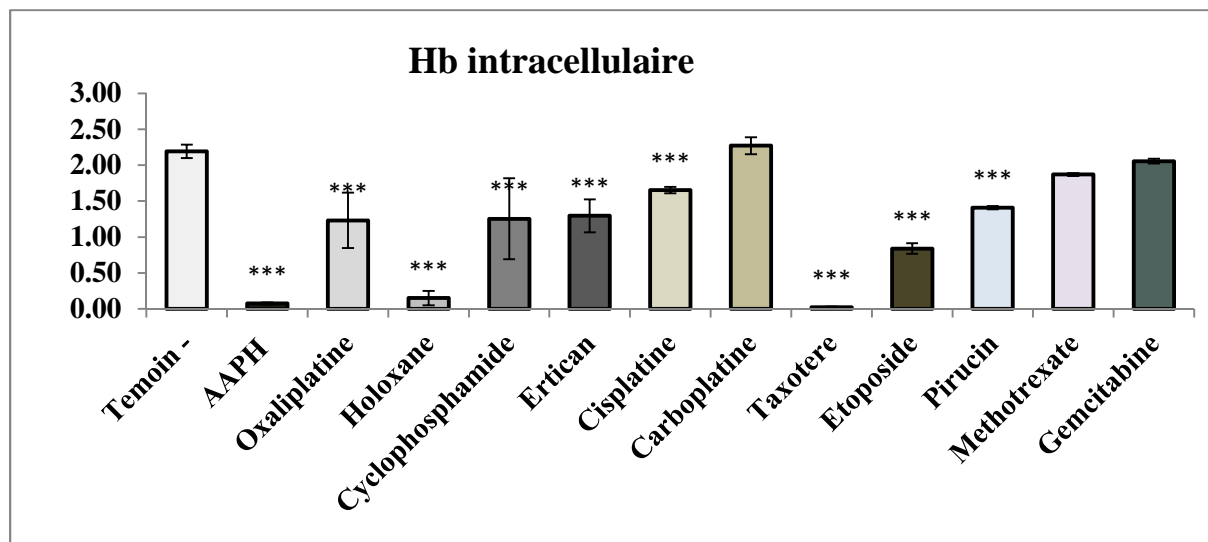
taux d'hémolyse qui est de 53,71% ; 79,42% et 80,48%, respectivement ces taux sont supérieurs à celui enregistré par le témoin positif AAPH (42,80%). Comme on note aussi des taux d'hémolyse modérés enregistrés par l'ertican, l'oxaliplatine, cisplatine, pirucin et gemcitabine avec un pourcentage de 34,92 % ; 21,30 % ; 12,17 ; 13,62 % et 10,72 %. Quant aux restes des molécules (cyclophosphamide, carboplatine et methotrexate) ont noté un faible taux d'hémolyse qui est presque similaire à celui enregistré par le témoin négatif (6,95%). Ces dernières sont donc considérées comme des molécules non toxiques pour les globules rouges.



**Figure 3:** Concentration des globules rouges après traitement avec les différentes molécules anticancéreuses. Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0.9% ; témoin positif : AAPH à 200 mM. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD de trois différentes expérimentations (n = 3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparé avec le contrôle négatif.

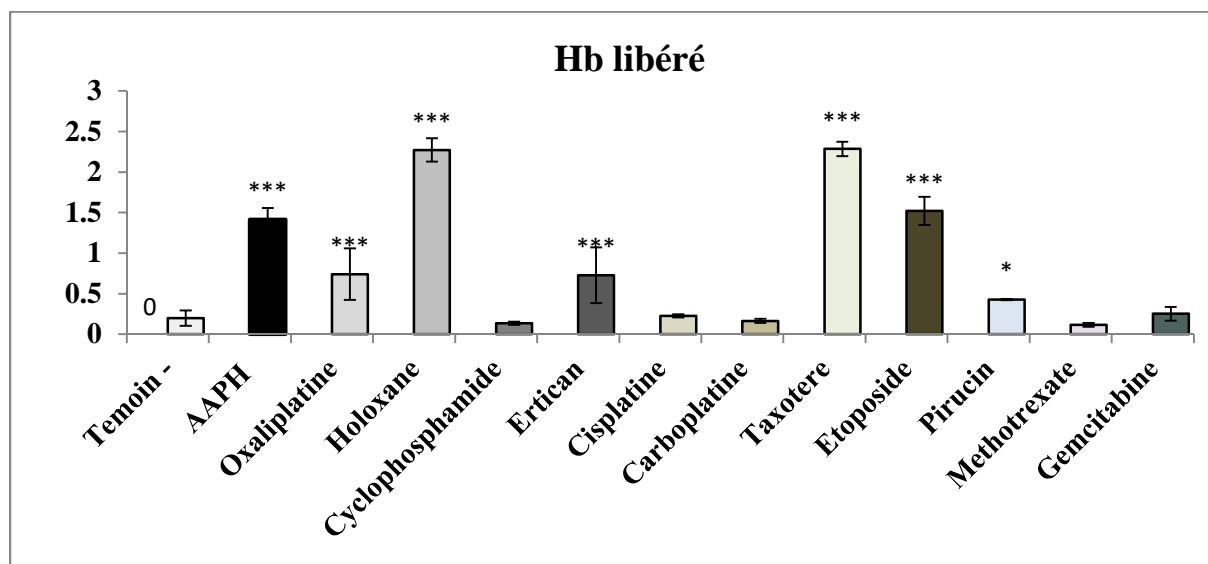
Les valeurs de la turbidité cellulaire montrent que les concentrations cellulaires les plus élevées ont été enregistrées par les anticancéreux qui présentent un faible % d'hémolyse ou similaire au témoin négatif ; ce qui signifie que ces anticancéreux n'induisent pas une cytotoxicité sur les GRs. Cependant, les molécules à forte hémolyse présentent une faible concentration cellulaire ce qui indique que ces molécules présentent un effet cytotoxique élevé sur les érythrocytes.

Nous avons confirmé nos résultats de l'effet des molécules anticancéreuses sur les globules rouges via la mesure de l'hémoglobine libérée et intracellulaire. Les résultats sont présentés dans les deux figures suivantes :



**Figure 4 :** Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec les différents agents de chimiothérapie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparé avec le contrôle négatif.

Les valeurs du dosage de l'hémoglobine intracellulaire vont dans le même sens des concentrations de globules rouges traités avec les agents de chimiothérapie ou avec le AAPH en comparaison aux résultats obtenues avec le témoin négatif.



**Figure 5 :** Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec les différents agents de chimiothérapie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparé avec le contrôle négatif.

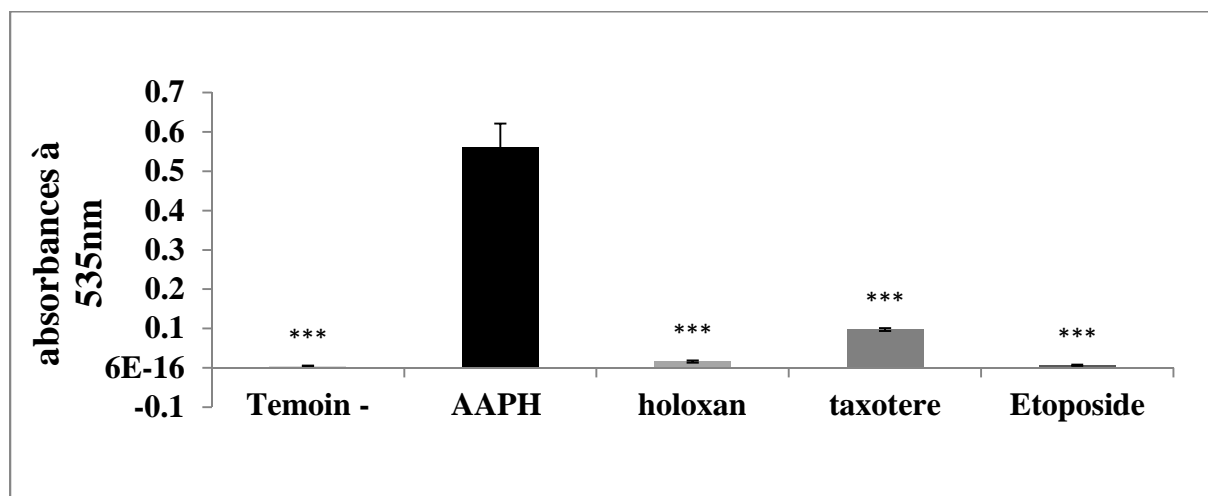


Les résultats montrent que les valeurs du dosage de l'hémoglobine libérée vont dans le sens opposé des concentrations cellulaires après traitement soit par les molécules anticancéreuses ou bien par le AAPH.

Nous remarquons que l'oxaliplatine, l'holoxan, l'ertican, le taxotère, l'étoposide et la pirucin présentent un taux élevé d'hémoglobine libérée avec une valeur de 0,74 ; 2,27 ; 0,73 ; 2,28 ; 1,52 et 0,43 respectivement qui sont significatives ( $P < 0,05$ ) en comparaison avec le témoin négatif. Ces résultats confirment alors la toxicité de ces molécules qui ont induit une lyse des GR avec libération de l'hémoglobine.

### III.2. Effet des anticancéreux sur les lipides membranaires

L'effet oxydant des molécules anticancéreuses sur la membrane cellulaire des globules rouges a été révélé par la mesure de la concentration du marqueur de peroxydation lipidique MDA (produit secondaire de l'oxydation des lipides) en utilisant le test de l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui donne une couleur rose claire après réaction des MDA avec l'acide thiobarbiturique (figure 7).



**Figure 7 :** Teneur en MDA des globules rouges traités par différents agents de chimiothérapie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M de trois différentes expérimentations ( $n = 3$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparé avec le contrôle positif.

Les lipides sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. Ils représentent la cible moléculaire des radicaux libres. Leur oxydation altère la structure de ces dernières provoquant ainsi la lyse de la cellule. Le dosage des aldéhydes par l'acide thiobarbiturique mesure non seulement le MDA, mais également les peroxydes lipidiques et les produits

d'auto-oxydation des acides gras qui donnent naissance à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique.

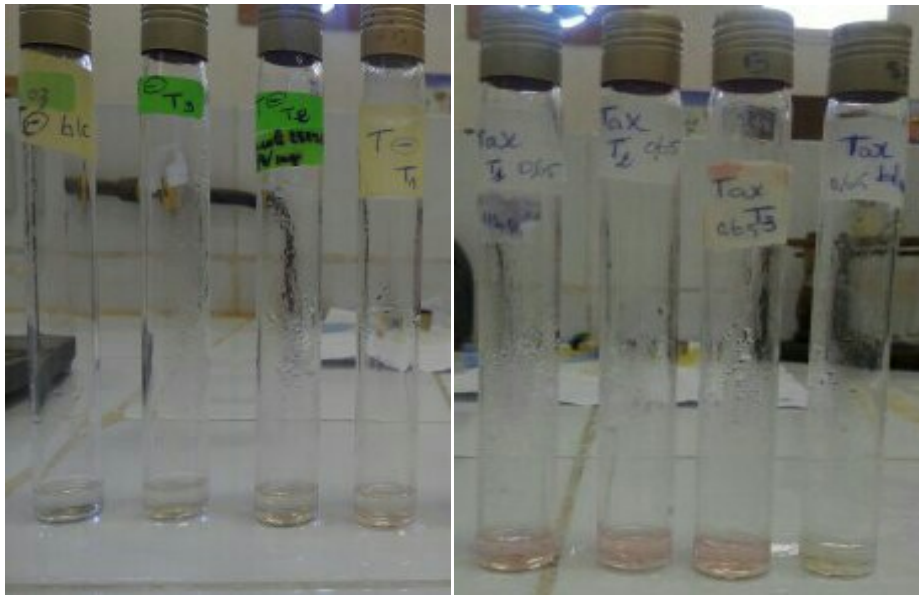
Le choix des molécules à tester est réalisé en fonction des résultats positifs obtenus avec le test d'oxydation des GR, dans le but de déterminer si l'effet cytotoxique des anticancéreux est issu de la peroxydation des lipides membranaire des érythrocytes.

Les résultats montrent que la peroxydation des lipides est significativement élevée après traitement par le taxotère et le AAPH.

En effet, les absorbances relatives au dosage indirect des molécules MDA formées varient en fonction de la molécule utilisée. La valeur la plus élevée est obtenue avec le taxotère qui est de 0,097 suivit par l'holoxan avec une valeur de 0,016. Quant à l'etoposide, les résultats montrent qu'il ne présente pas d'effet sur les lipides membranaires des érythrocytes (0,006), ce résultat est presque similaire au résultat obtenu avec le témoin négatif (0,0045). Concernant l'effet du AAPH sur la peroxydation lipidique, les résultats montrent que ce dernier exerce un potentiel effet sur la peroxydation des lipides de la membrane des érythrocytes (0,56). En effet, lorsque le AAPH est ajouté en tant qu'initiateur, il se décompose à température physiologique (37 °C) dans une solution aqueuse pour générer un radical alkyle (R•) qui, en présence d'oxygène, se converti en radicaux peroxyles (ROO•). Ces radicaux peroxyles induisent une oxydation des lipides polyinsaturés au niveau des membranes de globules rouges provoquant ainsi une réaction en chaîne connue sous le nom de peroxydation lipidique. Suite à cette peroxydation lipidique, la membrane des globules rouges subit des dégâts et perd son intégrité, ce qui conduit à la libération d'hémoglobine (hémolyse) et d'ions K<sup>+</sup> intracellulaires (**Banerjee et al, 2008**).

La peroxydation lipidique enregistré pour le taxotère dans nos résultats est cohérente avec les résultats obtenus par **Yang et al, 2009 ; Tabczar et al, 2013** qui ont eux aussi trouver que le taxotère induit une oxydation des lipides en mesurant le taux de MDA formées.

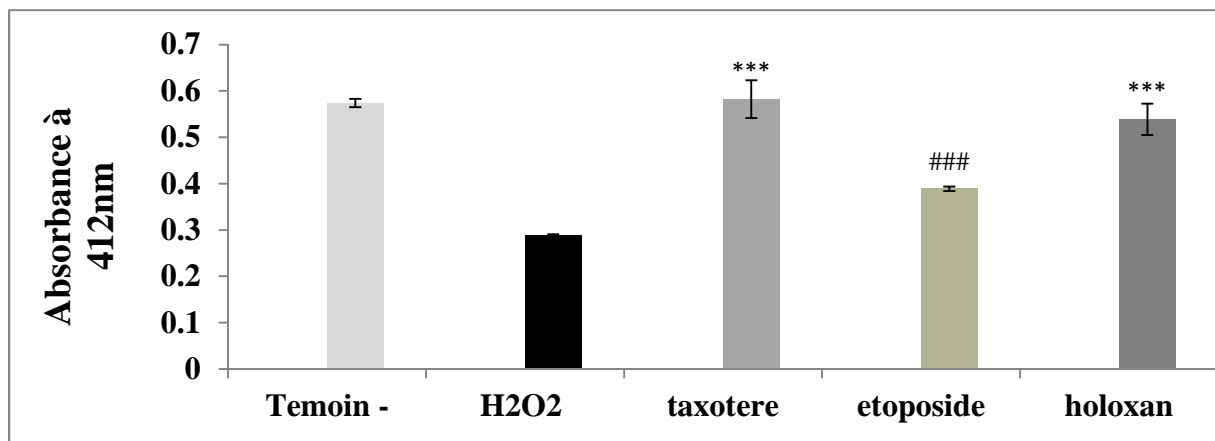
**Reinhart et al, 1998**, ont déduit que l'holoxan à interagit avec les membranes cellulaires des érythrocytes. Le taux de peroxydation lipidique enregistré par l'holoxan nous amène à supposer que son effet hémolytique sur les érythrocytes est exercé par oxydation des lipides.



**Figure 8 :** Photographie du témoin (-) et du taxotère (TAX).

### III.3. Effet des anticancéreux sur l'hémoglobine

Pour mieux comprendre la susceptibilité de l'hémoglobine à l'oxydation et l'effet des différents anticancéreux étudiés sur cette protéine, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la concentration en hémoglobine. Les résultats obtenus sont comparés au témoin positif qui correspond à l'oxydation de l'hémoglobine par le  $H_2O_2$ .



**Figure 8 :** Evaluation de l'effet des différents agents de chimiothérapie sur l'oxydation de l'hémoglobine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparé avec le contrôle positif.

Les résultats montrent que seul l'étoposide exerce un effet oxydant sur l'hémoglobine, les valeurs enregistrées à 412 nm correspondent aux quantités d'hémoglobine qui sont de 0,38 ; 0,53 et 0,58 pour l'étoposide, holoxan et taxotère, respectivement. Le résultat obtenu avec l'étoposide est presque similaire à celui obtenu avec le témoin positif  $H_2O_2$  (0,29). Quant aux deux autres molécules (holoxan et taxotère) nous n'avons pas observé d'effet oxydant sur l'hémoglobine, la quantité de cette dernière après traitement avec ces molécules est presque similaire à celle obtenue avec le témoin négatif (0,57). Ces résultats nous montrent clairement que l'holoxan et le taxotère exercent un effet hémolytique à travers l'oxydation des lipides membranaires des érythrocytes ce qui conduit à la perte de son intégrité et déstabilisation de ces cellules ce qui provoquera ainsi leur hémolyse. Par contre l'étoposide nous avons remarqué qu'il n'a pas d'effet sur la membrane cellulaire (peroxydation lipidique) mais cette molécule induit un effet hémolytique via l'oxydation de l'hémoglobine. En effet, l'hémoglobine oxydée s'accumule au niveau de la membrane des érythrocytes ce qui induit à la formation des corpuscules appelés corps de Heinz, ces derniers vont créer des perforations au niveau de la membrane cellulaire et ainsi leur hémolyse.

**Van Maanen et al, 1988** ont montré que l'étoposide conduit à une production de ERO. Nous pouvons ainsi supposer que l'oxydation de l'hémoglobine enregistré pour l'étoposide est du à la génération de ERO.

# CONCLUSION

### Conclusion

Ce travail nous a permis de mettre en évidence par des tests *in vitro* les molécules ayant un effet cytotoxique par action directe sur les érythrocytes du sang.

L'activité hémolytique des molécules anticancéreuses a été déterminée par la mesure du taux d'hémolyse des érythrocytes qui est plus important avec certains anticancéreux à savoir le Taxotère avec (80,40%), l'Holoxan avec (79,42%) et l'Etoposide avec (53,71%).

L'effet oxydant des chimiothérapies dépend de la molécule utilisée, la dose et la voie d'administration.

Pour explorer le mécanisme d'action de ses médicaments chimiothérapeutiques sur l'oxydation des globules rouges nous avons évalué l'effet de ces molécules sur les lipides membranaires et l'oxydation de l'hémoglobine.

Les résultats de la présente étude ont montré que certains agents anticancéreux exercent un effet hémolytique direct sur les globules rouges soit en induisant une peroxydation lipidique ou bien par oxydation de l'hémoglobine.

Cette étude nous a éclaircie le mécanisme de toxicité de certaines molécules anticancéreuses sur les globules rouges, cependant il est intéressant d'étudier d'autres molécules que celles que nous avons utilisé à fin d'explorer d'autres mécanismes de toxicité sur les globules rouges, dans un but de savoir s'il existe des molécules qui peuvent induire un effet oxydant par une éventuelle action sur les enzymes érythrocytaire comme exemple la SOD ou sur les différentes protéines incluses dans le globule rouge.

En vue d'une progression vers des essais cliniques, il est bien entendu indispensable de confirmer nos résultats obtenus sur l'effet hémolytique des anticancéreux.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

*Références bibliographiques**A*

**ALAIN NUHRICH.** (2015). Médicaments Antitumoraux dérivés du Platine.

**Alexander Link, Francesc Balaguer, and Ajay Goel.** (2010). Cancer Chemoprevention by Dietary Polyphenols: Promising Role for Epigenetics. 80(12): 1771–1792.

**Alugoju Phaniendra • Dinesh Babu Jestadi • Latha Periyasamy.** (2014). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem*; 30(1):11–26.

**Ana Costa, Alix Scholer-Dahirell, and Fatima Mechta-Grigoriou.** (2014). The Role of Reactive Oxygen Species and Metabolism on Cancer cells and their Microenvironment. Inserm, U830, Paris, F-75248, France.

**Andrew R Collins.** (2005). Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr* ; 81(suppl):261S–7S.

**Anke M. Leufkens, Frañzel J. B. van Duijnhoven, Sjoukje H. S. Woudt, Peter D. Siersema, Mazda Jenab, Eugene H. J. M. Jansen, Tobias Pischon, Anne Tjønneland, Anja Olsen, Kim Overvad, Marie Christine Boutron-Ruault, Francoise Clavel-Chapelon, Sophie Morois, Domenico Palli, Valeria Pala, Rosario Tumino, Paolo Vineis, Salvatore Panico, Rudolf Kaaks, Annekatrin Lukanova, Heiner Boeing, Krasimira Aleksandrova, Antonia Trichopoulou, Dimitrios Trichopoulos, Vardis Dilis, Petra H. Peeters, Guri Skeie, Carlos A. Gonza'lez, Marcial Argu'elles, Mari'a-Jose' Sa'nchez, Miren Dorronsoro, Jose' Mari'a Huerta, Eva Ardanaz, Go ran Hallmans, Richard Palmqvist, Kay-Tee Khaw, Nick Wareham, Naomi E. Allen, Francesca L. Crowe, Veronika Fedirko, Teresa Norat, Elio Riboli, and H. Bas Bueno-de-Mesquita.** (2011). Biomarkers of Oxidative Stress and Risk of Developing Colorectal Cancer: A Cohort-nested Case-Control Study in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition. *American Journal of Epidemiology*.



**A. Tiotiu, C. Clément-Duchêne, Y. Martinet.** (2015). Prise en charge de l'anémie chimio-induite dans le cancer bronchique. *Revue des Maladies Respiratoires* (2015) 32, 809-821.

**Andrea Wong, Ross A. Soo, Wei-Peng Yong, and Federico Innocenti.**(2009). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metabolism Reviews*; 41(2): 77–88.

## B

**BALDASSARRE STEA, MD, PHD,\* LISA J. HAZARD, MD, VICTOR J. GONZALEZ, MD, AND RUSSELL HAMILTON, PHD.** (2011). The Role of Radiation Therapy in the Control of Locoregional and Metastatic Cancer. *J. Surg. Oncol*; 103:627–638.

**B. Calderona, C. Guerderb, M. Resbeutc, N. Fakhryd, C. Dupuise, D. Cowena.** l'Observance et résultats de la chimioradiothérapie concomitante après chimiothérapie d'induction par docétaxel, cisplatine et 5-fluoro-uracile pour les cancers de la tête et du cou localement évolués cancers.

**Bellik, Y. and M. Iguer-Ouada (2016).** "Concurrent measurement of cellular turbidity and hemoglobin to evaluate the antioxidant activity of plants." *Food Chemistry* **190**: 468-473.

**Bruno LANDI (1), Thierry LECOMTE (1), Anne BERGER (2), Christophe CELLIER (1).** (2004). Traitement des tumeurs stromales digestives. *Gastroenterol Clin Biol* ; 28:893-901.

**Bryan G. Allen<sup>1</sup>, Sudershan K. Bhatia<sup>1</sup>, John M. Buatti<sup>1</sup>, Kristin E. Brandt<sup>1</sup>, Kaleigh E. Lindholm<sup>1</sup>, Anna M. Button<sup>2</sup>, Luke I. Szweda<sup>3</sup>, Brian J. Smith<sup>2</sup>, Douglas R. Spitz<sup>1</sup>, and Melissa A. Fath<sup>1</sup>.** (2013). Ketogenic Diets Enhance Oxidative Stress and Radio-Chemotherapy Responses in Lung Cancer Xenografts. Melissa Fath, Department of Radiation Oncology, Holden Comprehensive Cancer Center, Iowa City, IA 52242.

## C

**Camille Migdal, Mireille Serres.** (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 2011 ; 27 : 405-12.

**Catherine Amalric Regine Chevrier . Mireille Jouannet . Genevieve Julien . Aude Lambert . Catherine Devillers . Isabelle Perard . Emmanuel Deligeard . Helena Bertucat.** (2017). MODALITES DE RECONSTITUTION-DILUTION DES SPECIALITES ANTICANCEREUSES.

**Charles F. Spurlock III<sup>1</sup>, Henry M. Gass IV<sup>2,\*</sup>, Carson J. Bryant<sup>3</sup>, Benjamin C. Wells<sup>3</sup>, Nancy J. Olsen<sup>4</sup> and Thomas M. Aune<sup>1,2</sup>.** (2015). Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*; 54:178\_187.

**Chiara Gorrini, Isaac S. Harris and Tak W. Mak.** (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Harvard Medical School, 240 Longwood Ave, Boston, Massachusetts 02115, USA.*

**Christine C Winterbourn.** (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.

**Christophe Paris, Isabelle Stucker.** (2016). Multi-expositions et risque de cancer : approche épidémiologique. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 2016;77:494-495.

**C. Mascaux.**(2016). La cancérogénèse. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités* 8, 319-324.

**Corinne Isnard-Bagnis, Bruno Moulin , Vincent Launay-Vacher , Hassan Izzedine , Isabelle Tostivint , Gilbert Deray.** (2005) . Toxicité rénale des anticancéreux. *Néphrologie & Thérapeutique* 1 101–114.M.

**C. Panis • V. J. Victorino • A. C. S. A. Herrera • L. F. Freitas • T. De Rossi • F. C. Campos • A. N. Colado Simão • D. S. Barbosa • P. Pinge-Filho • R. Cecchini • A. L. Cecchini .** (2011). Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133:881–888.

**C.Pozzo1, C. Barone1\*, J. Szanto2, E. Padi2, C. Peschel3, J. Bu`kki3, V. Gorbunova4, V. Valvere5, J. Zaluski6, M. Biakhov7, E. Zuber8, C. Jacques8 & R. Bugat9.** (2004). Irinotecan in combination with 5-fluorouracil and folinic acid or with cisplatin in patients with advanced gastric or esophageal-gastric junction adenocarcinoma: results of a randomized phase II study. *Annals of Oncology* 15: 1773–1781.

## D

**Dimitri Psimaras, Flavie Bompaire, Damien Ricar.** (2010). Complications neurologiques périphériques des traitements anticancéreux. *Neurologie.com* 2(8) : 197-201.

**Dmitry B. Zorov, Magdalena Juhaszova, and Steven J. Sollott.** (2014). MITOCHONDRIAL REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND ROS-INDUCED ROS RELEASE. *Physiol Rev* 94: 909–950.

**Dr. A. D'Oro.** (2010). Intérêt de l'évaluation du stress oxydant. [lanutrition-sante.ch](http://lanutrition-sante.ch).

**Dr Hamidi K, Tunisie.** (2013). La cancérogenèse, un processus multi-étapes.

**Dr J. Collard.** (2014). Les marqueurs biologiques du stress oxydant. Laboratoire Dr Collard SC/SPRL - Synlab Belgique.

## E

**D. Apretna, F. Thiessard, G. Miremont-Salamé, F. Haramburu.** (2004). Pharmacovigilance, cancer et médicaments anticancéreux. *Oncologie* 6: 66-71.

**Emna Gaies\*, Nadia Jebabli, Sameh Trabelsi, Issam Salouage, Rim Charfi, Mohamed Lakhhal and Anis Klouz.** (2012). Methotrexate Side Effects: Review Article. *J Drug Metab Toxicol* Volume 3 • Issue 4 • 1000125. ISSN: 2157-7609 JDMT, an open access journal.

**Essomba EN, Ngaba GP, Dina Bell, Ngo NT, Kedy CDK, Mouelle AS, Coppieters Y.** (2015). Prise en charge des anémies chez les patients cancéreux à Douala, Cameroun. *Faculté de Médecine et de sciences pharmaceutiques de Douala*.

**F**

**Favier, A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.108– 115.

**F.Lokiec.** (2007). Ifosfamide : des propriétés pharmacocinétiques intéressantes pour prévenir la survenue de métastases cérébrales dans certains cancers. *Oncologie* ; 9: 790–794.

**F.Miche. D. Bonnefont-Rousselot. E. Mas . J. Draï. P. Thérond.** (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* 2008 ; 66 (6) : 605-20.

**Frederic Batteux, Olivier Cerles, Carole Nicco.** (2014). Cancer, formes réactives de l'oxygène et neuropathies périphériques chimio-induites. Département reproduction, développement et cancer, Inserm U1016, hôpital Cochin, pavillon G. Roussy, 8, rue Mechain 75014 Paris, France.

**Frédéric Lamblin, Christophe Hano, Ophélie Fliniaux, François Mesnard, Marc-André Fliniaux, Éric Lainé.** (2008). Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. *MEDECINE/SCIENCES* ; 24 : 511-9.

**G**

**Gareth J. Veal , Michael Cole , Girish Chinnaswamy , Julieann Sludden , David Jamieson , Julie Errington , Ghada Malik , Christopher R. Hill , Thomas Chamberlain , Alan V. Boddy.** (2016). Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer* 55 (2016) 56e64.

**Grzegorz Bartosz.** (2003). Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems.

**Guru R. Valicherla<sup>1,2</sup>, Kandarp M. Dave<sup>3</sup>, Anees A. Syed<sup>1</sup>, Mohammed Riyazuddin<sup>1</sup>, Anand P. Gupta<sup>1</sup>, Akhilesh Singh<sup>4</sup>, Wahajuddin<sup>1,2</sup>, Kalyan Mitra<sup>5</sup>, Dipak Datta<sup>4</sup> & Jiaur R. Gayen<sup>1,2</sup>.** (2016). Formulation optimization of Docetaxel loaded self-emulsifying drug delivery system to enhance bioavailability and anti-tumor activity.

*H*

**Halliwell, B.; Chirico, S. (1993).** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **57**: S715–S725.

**Helene Pelicano , Dennis Carney , Peng Huang.** (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates* 7, 97–110.

**Helmut Sies, Carsten Berndt and Dean P. Jones.** (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86:25.1–25.34.

*J*

**Jean-Jacques Monsuez.** (2009). Mécanismes de la toxicité cardiaque des chimiothérapies anticancéreuses. *Médecine interne et addictologie, hôpital Paul-Brousse, Villejuif*.

**J. Haleng (1), J. Pincemail (2), J.O. Defraigne (3), C. Charlier (4), J.P. Chapelle (5).** (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62 : 10 : 628-638.

**Jing Yu, MD, Jing Xiao, MD, Yifan Yang, MD, and Bangwei Cao, MD.** (2015). Oxaliplatin-Based Doublets Versus Cisplatin or Carboplatin- Based Doublets in the First-Line Treatment of Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer. *Medicine* 94(27):e1072.

**J.L. Merlin.** (2008). Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie. *La Lettre du Pharmacologue*; 22(2):51-62.

**J. M. S. van Maanen,\* J. Retel, J. de Vries, H. M Pinedo.** (1988). Mechanism of Action of Antitumor Drug Etoposide: A Review. *Journal of the National Cancer Institute*.

**J. Pincemail (1), C. Le Goff (2), C. Charlier (3), P. Gillion (4), JP. Cheramy-Bien (1), E. Van Honacker (5), JP. Chapelle (2) et JO. Defraigne (1) - Université de Liège – CHU Sart Tilman (Liège, Belgique).** (2009). Evaluation biologique du stress oxydant Application en routine

**J.O. DEFRAIGNE (1), J. PINCEMAIL (2).** (2008). STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS : mythes et réalités. Rev Med Liège 2008; 63 : Synthèse 12 2008 : 10-19.

## K

**Kirsten Stinkens, MD. Karolien Vanhove, MD. Michiel Thomeer, MD, PhD.** (2015). Metabolomics a Novel Biomarker in Lung Cancer. © 2015 by the International Association for the Study of Lung Cancer ISSN: 1556-0864/15/1006-0e46.

## L

**Link, A., Balaguer, F., and Goel, A.** (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: prostate cancer cell apoptosis. J Biol Chem 279, 29302-29307.

## M

**Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin.** (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 (2007) 44–84.

**Maurice Tubiana.** (2008). Généralités sur la cancérogenèse. C. R. Biologies 331 114–125.

**Mauricio Burotto, Vinay Prasad, Tito Fojo.** (2015). Non-inferiority trials: why oncologists must remain wary. Medical Oncology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

**Michel Gérin, Pierre Band.** (2003). Cancer. Environnement et santé publique – Fondements et pratique, PP. 669-686.

**ML Alvarellos, JK Lamba, K. Sankuhl, CF Thorn, L. Wang, DJ Klein, RB Altman, TE.** (2014). Gemcitabine Pathway, Pharmacokinetics/Pharmacodynamics.

**M. Soulié, G. Portier, L. Salomon.** (2015). Principes oncologiques du contrôle local de la tumeur primitive. Progrès en urologie 25, 918-932.

**Monique Gardès-Albert, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh et Daniel Jore.** (2003) . Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ?

**Mulder RL, Paulides M, Langer T, Kremer LCM, van Dalen EC.** (2015). Cyclophosphamide compared to ifosfamide for the treatment of sarcoma in children and young adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 9. Art. No.: CD006300.

## N

**Neil Thomas Mason, Nikhil I. Khushalani, Jeffrey S. Weber, Scott Joseph Antonia, Howard L. McLeod; H. Lee Moffitt. Cancer Center & Research Institute, Tampa, FL; NYU Langone Medical Center, New York, NY; Moffitt Cancer Center, Tampa, FL.** (2016). Modeling the cost of immune checkpoint inhibitor-related toxicities. *J Clin oncol* 34, (supl; abstr 6627).

**N. M. Martins,<sup>1</sup> N. A. G. Santos,<sup>1\*</sup> C. Curti,<sup>2</sup> M. L. P. Bianchi<sup>1</sup> and A. C. Santos<sup>1</sup>.** (2007). Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J. Appl. Toxicol.* 2008; 28: 337–344.

**N. M. Martins, N. A. G. Santos, C. Curti, M. L. P. Bianchi<sup>1</sup> and A. C. Santos.** (2007). Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J. Appl. Toxicol*; **28**: 337–344.

**N Pabla and Z Dong.** (2008). Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. Department of Cellular Biology and Anatomy, Medical College of Georgia, 1459 Laney Walker Blvd, Augusta, Georgia 30912, USA.

## O

**Oktay Tacar, Pornsak Sriamornsak and Crispin R. Dass.** (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, pp. 157–170.

**Ofer Yossepowitch, Ilya Pinchuk, Uri Gur, Avivit Neumann, Dov Lichtenberg and Jack Baniel.** (2007). Advanced but Not Localized Prostate Cancer is Associated With Increased Oxidative Stress.

**P**

**Paul Benkimoun, Juliette Garnier et Pascale Santi.** (2017). Traitement du cancer du sein : enquête sur le docétaxel après plusieurs décès.

**Pourroy Bertrand<sup>1\*</sup>, Correard Florian<sup>1</sup>, Savry Amandine<sup>1</sup>, Gauthier-Villano Laurence<sup>1</sup> and Pisano Pascale<sup>2</sup>.** (2015). Safety and Efficacy of Generic Drug Substitution in Oncology: A Warning on Gemcitabine Generics Used For Endovesical Instillation.

**Prathap Kumar S. Mahalingaiah, Kamaleshwar P. Singh.** (2014). Chronic Oxidative Stress Increases Growth and Tumorigenic Potential of MCF-7 Breast Cancer Cells. Mahalingaiah PKS, Singh KP PLoS ONE 9(1): e87371.

**R**

**Regina Jitschin,<sup>1</sup> Andreas D. Hofmann,<sup>1</sup> Heiko Bruns,<sup>1</sup> Andreas Giebl,<sup>2</sup> Juliane Bricks,<sup>1</sup> Jana Berger,<sup>1</sup> Domenica Saul,<sup>1</sup> Michael J. Eckart,<sup>3</sup> Andreas Mackensen,<sup>1</sup> and Dimitrios Mougiakakos<sup>1</sup>.** (2014). Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2014;123(17):2663-2672.

**Reinhart WH, Baerlocher GM, Cerny T, Owen GRh, Meiselman HJ, Beer JH.** (1999). Ifosfamide-induced stomatocytosis and mesna-induced echinocytosis: influence on biorheological properties of blood. Eur J Haematol: 62: 223-230.

**Rodrigo Franco, Onard Schoneveld b, Alexandros G. Georgakilas , Mihalis I. Panayiotidis.** (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer Letters 266 (2008) 6–11.

**Roy S. Herbst<sup>1</sup> and Fadlo R. Khuri<sup>2</sup>.** (2003). Mode of action of docetaxel – a basis for combination with novel anticancer agents. CANCER TREATMENT REVIEWS; 29: 407–415.



## S

**Sabina Tabaczar<sup>1</sup>, Anna Pieniążek<sup>2</sup>, Jan Czepas<sup>1</sup>, Joanna Piasecka-Zelga<sup>3</sup>, Krzysztof Gwoździński<sup>1</sup> and Aneta Koceva-Chyła<sup>2</sup>.** (2013). Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *Gen. Physiol. Biophys.* **32**, 535–543.

**Sara M. Johnson, Xiaofu Wang, and B. Mark Evers.** (2009). triptolide inhibits proliferation and migration of colon cancer cells by inhibition of cell cycle regulators and cytokine receptors. *J Surg Res* 168(2): 197–205.

**S. David.** (2009). Anémie et médicaments. *Cabinet d'hématologie, 19, rue Noël Sylvestre, 34500 Béziers, France.*

**Serge Leyvraz , Sandro Pampallona , Giovanni Martinelli , Ferdinand Ploner , Lucien Perey , Savina Aversa , Solange Peters , Paal Brunsvig , Ana Montes , Andrzej Lange , Ugur Yilmaz , Giovanni Rosti.** (2008). A Threefold Dose Intensity Treatment With Ifosfamide, Carboplatin, and Etoposide for Patients With Small Cell Lung Cancer: A Randomized Trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100: 533 – 541.

**Sébastien Faure.** (2010). Anticancereux cytotoxiques. *Actualités pharmaceutiques* n° 497.

**Sharon Marsh and Janelle M Hoskins.** (2010). Irinotecan pharmacogenomics.

**Sivoňová, M.; Waczulíková, I.; Kilanczyk, E.; Hrnčiarová, M.; Bryszewska, M.; Klajnert, B.; Ďuračková, Z.** (2004). The effect of pycnogenol on the erythrocyte membrane fluidity. *Genetic Physioogy and Biophysic.* **23**: 39–51.

**Stéphane BENOIST.** (2007). Comment prendre en charge les cancers du rectum avec métastases synchrones ? *Gastroenterol Clin Biol*;31:1S75-1S80.

**Sybille\_Merceron (photo), Abdelmalek\_Ghimouz, Philippe\_Goater, Marc\_Esteve.** (2006). Y a-t-il une conduite à tenir spécifique pour la gestion périopératoire des patients sous

chimiothérapie cytotoxique\_? S.\_Merceron, Département d'anesthésie-réanimation-douleur, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris.

**Syed Sultan Beevi, Muzib Hassanal Rasheed, Arumugam Geetha.** (2007). Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta* 375 (2007) 119–123.

**SOYEON J KONG, Roberd Bostick, W. Dana Flanders, et al.** (2014). Oxidative Balance Score, Colorectal Adenoma, and Markers of Oxidative Stress and Inflammation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*

**S. Zimmer-Rapuch, N. Janus, S. Amet, G. Deray, V. Launay-Vacher.** (2010). Néphrotoxicité des médicaments anti- cancéreux en hématologie : description, mécanismes et prise en charge. *Correspondances en Onco-hématologie - Vol. V - n° 4.*

### T

**T. Jonathan Yang, Abraham J. Wu.** (2016). Cranial irradiation in patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer brain metastases. Department of Radiation Oncology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA.

**TOMRIS OZBEN.** (2007). Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 96, 2181–2196.

### V

**Valérie Delavigne.** (2009). *Les cancers.* ©Springer-Verlag France 978-2-287-85840-6.

**Vanessa Battisti a,\* , Lie´ si D.K. Maders a, Margarete D. Bagatini a, Luiz Gustavo B. Reetz b, Juarez Chiesa b, Iara E. Battisti c, Jamile F. Gonc,alves d, Marta M.F. Duarte a, Maria R.C. Schetinger a, Vera M. Morsch.** (2011). Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 65 (2011) 516–524.

**Vanessa J. Victorino & Fernanda C. Campos & Ana C. S. A. Herrera & Andréa N. Colado Simão & Alessandra L. Cecchini & Carolina Panis & Rubens Cecchini.** (2013). Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer.

**Van Maanen et al, 1988** ont montré que l'etoposide conduit à une production de ERO. Nous pouvons ainsi supposer que l'oxydation de l'hémoglobine enregistré pour l'etoposide est du à la génération de ERO.

**V. Regnier-Denois · J. Poirson · F. Soum Pouyalet · F. Chauvin.** (2009). La chimiothérapie par voie orale : représentations et pratiques des oncologues et des patients. *Psycho-Oncol.* 3:168-175

**Volodymyr I. Lushchak.** (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Department of Biochemistry and Biotechnology, Precarpathian National University named after Vassyl Stefanyk, 57 Shevchenko Str., Ivano-Frankivsk 76025, Ukraine.

### X

**X-D Zhang [2, 3], E Varin (b), H Lincet [2], S Allouche [4], M Paciencia [5], A Coquerel [6], L Poulain [2], P Gauduchon, P Icard [1, 2].** (2009). New antineoplastic treatment with cancer cells antienergy molecules: 3-Bromopyruvate or citrate – Experimental results in mesothelioma. *e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 9 (4) : 058-071.

**XIN YAO, MD; KESSARIN PANICHPISAL, MD; NEIL KURTZMAN, MD; KENNETH NUGENT, MD.** (2007). Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. Dr. Kenneth Nugent, Department of Internal Medicine, Texas Tech University Health Science Center, 3601 4<sup>th</sup> Street, Lubbock, TX 79430.

**Xinyuan Li, Pu Fang, Jietang Mai, Eric T Choi, Hong Wang and Xiao-feng Yang.** (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 6:19.

**Xu-Jun Qin, Wei He, Chun-Xu Hai,\* Xin Liang and Rui Liu.** (2008). Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy. *J. Appl. Toxicol.* 2008; 28: 271–282.

## Y

**Y. Dotan, D. Lichtenberg, I. Pinchuk.** (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 43 (2004) 200–227.

**Ye-Rin Lee, Min-Hee Kang, Hee-Myung Park .** (2015). Anthracycline-induced cardiomyopathy in a dog treated with epirubicin. *Can Vet J* 2015;56:571–574.

**Y. Gernez, F. Barlesi, P. Astoul, A. Magnan.** (2006). Hypersensibilité au carboplatine : Un rôle pour les génériques ? *Rev Mal Respir* ; 23 :269-72.

**Yoshihito Iuchi.** (2012). Anemia Caused by Oxidative Stress. Yamaguchi University Japan.


## Z

**Zhijun Yang, David W. F. Fong, Linlin Yin, Yuenfan Wong, and Wenhua Huang.** (2009). Liposomes modulate docetaxel-induced lipid oxidization and membrane damage in human hepatoma cells. *Journal of Liposome Research*; 19(2): 122–130.

# ANNEXE

## Annexe

Noms des médicaments anticancéreux utilisés et leurs présentations.

La molécule	La classe	Indication	Mode d'action	Dose administrée en clinique	référence
<p>Ifosfamide (Holoxan®) (40mg/ml)</p> 	<p>Agents alkylants</p>	<p>l'Holoxan est utilisé dans les tumeurs solides tels que le cancer du sein, sarcomes, ainsi que le cancer de la sphère ORL en rechute ou métastatique, cancer de l'ovaire en rechute, Cancers bronchiques...</p>	<p>Est un anticancéreux largement utilisé en chimiothérapie. Son mode d'action est l'alkylation de l'ADN en se liant à la guanine par son radical électrophile. Cela va conduire à la formation de ponts inter ou intra-caténaux pour conséquence une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN aboutissant à la destruction cellulaire.</p>	<p>La concentration administrée pour le patient ne doit pas dépasser 4% (c'est-à-dire la concentration doit être entre 0.6 et 40 mg/ml).</p>	<p>(Lokiec, 2007 ; Leyvraz et al, 2008 ; Mulder et al, 2015 ; Amalric et al, 2017).</p>

Cyclophosphamide  
(Endoxane®)  
(20 mg/ml)





Agents alkylants

Il est utilisé dans le traitement de certains cancers du poumon, cancer de l’ovaire, cancer de sein...



Le Cyclophosphamide est un antimétabolite alkylant. Il agit sur la molécule d’ADN en formant des liaisons covalentes avec les substrats nucléophiles par l’intermédiaire de ses radicaux alcoyles. Cette action entraîne des modifications profondes de l’ADN, ainsi que la formation de ponts alcoyles intra et inter-brins par conséquent une inhibition de la transcription et de la réplication de l’ADN.



La concentration utilisée en clinique est entre (1 – 4.5 mg/ml).



(*Mulder et al, 2015 ; Veal et al, 2016 ; Amalric et al, 2017*).


<p>Etoposide (Vépéside®) (20 mg/ml)</p>		<p>Inhibiteur de la topo- isomérase II</p>	<p>Il est utilisé comme traitement pour divers cancers : cancer du poumon, du testicule, lymphome, leucémie et le glioblastome.</p>	<p>Est un dérivé semi-synthétique de la podophyllotoxine faiblement hydrosoluble. L'étoposide inhibe l'entrée en mitose des cellules tumorales (phase S et G3) par action sur la topoisomérase II qui est chargé de ressouder les brins d'ADN après leurs cassures.</p>	<p>La concentration utilisée est entre (0.2 – 0.4 mg/ml).</p>	<p>(Leyvraz et al, 2008 ; Lamblin et al, 2008 ; Amalric et al, 2017).</p>
<p>Carboplatine (Paraplatine®) (10mg/ml)</p>		<p>Agents alkylants</p>	<p>Le carboplatine est utilisé comme molécule anticancéreuse dans le traitement de plusieurs cancers tel que les cancers des ovaires, les cancers bronchiques et les cancers de la sphère ORL.</p>	<p>Est un composé organométallique du platine. Son action est proche de celle du cisplatine, il se fixe sur la molécule d'ADN en produisant des liaisons alkyles responsables de la formation de ponts inter ou intra-brins ce qui induit l'inhibition de la réplication de l'ADN ainsi que les synthèses de l'ARN et des protéines cellulaires et donc la mort cellulaire.</p>	<p>La concentration utilisée en clinique est entre (0.5 – 2 mg/ml).</p>	<p>(Gernez et al, 2006 ; Leyvraz et al, 2008 ; Yu et al, 2015 ; Nuhrich, 2015).</p>



<p>Gemcitabine (Gemzar®) <b>(100mg/ml)</b></p> 	<p>Les Anti- métabolites</p>	<p>La gemcitabine est un traitement de différents types de tumeurs solides, y compris le pancréas, le cancer du poumon non à petites cellules, du sein et du sang.</p>	<p>Est un analogue nucléosidique cytotoxique. Elle interfère avec la synthèse de l'ADN en incorporant l'ADN allongé et entrave indirectement la réplication de l'ADN en inhibant la voie de récupération des nucléosides.</p>	<p>Sa concentration est entre (1 – 10 mg/ml).</p>	<p>(Wong et al, 2009 ; Alvarellos et al, 2014 ; Bertrand et al, 2015 ; Amalric et al, 2017).</p>
<p>Cisplatine (Cisplatine®) <b>(10 mg/ml)</b></p> 	<p>Agents alkylants</p>	<p>Est un traitement de plusieurs cancers tels les sarcomes, cancer du poumon, de l'ovaire, du testicule, du col utérin et de l'endomètre, de la sphère ORL et de l'œsophage et cancer de la vessie.</p>	<p>Est un complexe a base de platine, il se fixe sélectivement sur les bases puriques de l'ADN (A ou G) et induit une variation de la conformation locale du double brin d'ADN. Cette déformation inhibe la réplication et la transcription de l'ADN ce qui induit la mort cellulaire.</p>	<p>La concentration administrée pour les malades ne doit pas dépassée (1mg/ml).</p>	<p>(Yu et al, 2015 ; Calderonet al, 2015 ; Nuhrich, 2015 ; Amalric et al, 2017).</p>

<p>Docétaxel (Taxotère®)  (20 mg/ml)</p> 	<p>Agents intercalants</p>	<p>Le taxotère est utilisé pour soigné les cancers de l’ovaire, cancer du sein, cancer du poumon, cancer de la prostate, cancer du carcinome, cancer estomac. Il peut également s’utiliser pour soigner le cancer de la tête et du cou.</p>	<p>Est un agent antinéoplasique, il tue les cellules cancéreuses en parasitant l’action du matériel génétique (ADN) et cela par la stabilisation des microtubules en inhibant leur dépolymérisation par liaison stable à la tubuline et entraine un blocage de la mitose.</p>	<p>Les concentrations administrées pour les patients doivent être entre (0.3 - 0.74 mg/ml).</p>	<p>(Herbst et al, 2003 ; Valicherla et al, 2016 ; Benkimoun et al, 2017 ; Amalric et al, 2017 ).</p>
<p>Epirubicine (Farmorubicin®)  (2mg/ml)</p> 	<p>Inhibiteur de la topo- isomérase II</p>	<p>Il est employé pour traiter : le cancer du sein, de l’ovaire, cancer du poumon, cancer de l’estomac, cancer de la vessie, cancer de l’œsophage, du foie et du pancréas.</p>	<p>Est une chimiothérapie de la famille des anthracyclines qui agit comme intercalant de l’ADN elle se lie à cette molécule d’ADN et inhibe l’action des polymérase des acides nucléiques.</p>	<p>La concentration utilisée est entre (0.4 - 1.6 mg/ml).</p>	<p>(Lee et al, 2015 ; Amalric et al, 2017).</p>

<p>Oxaliplatine (Eloxatine®) (5mg/ml)</p> 	<p>Agents alkylants</p>	<p>L'Oxaliplatine est utilisée dans la prise en charge de cancers colorectaux.</p>	<p>Est un agent antinéoplasique appartenant à la classe des platines. Il inhibe la réplication et la transcription de l'ADN par une action alkylante en formant des ponts intra-brins entre deux guanines adjacentes.</p>	<p>Sa concentration doit être entre (0.2 – 2 mg/ml).</p>	<p>(Yu et al, 2015 ; Nuhric, 2015 ; Amalric et al, 2017).</p>
<p>Irinotécan (Campto®) (20 mg/ml)</p> 	<p>Inhibiteur de la topoisomérase I</p>	<p>Irinotécan est utilisé pour le traitement des métastatiques, cancer colorectal, cancer de l'ovaire et du poumon non à petites cellules.</p>	<p>est un pro-médicament métabolisé en forme active et dont se métabolite actif inhibe la topoisomérase 1 induisant des cassures de l'ADN et cela en se liant au complexe ADN-topoisomérase I lors de la réplication de l'ADN, empêchant le resserrement des ruptures à un seul brin ce qui inhibe le mécanisme de réplication.</p>	<p>Sa concentration d'utilisation est entre (0.12 – 2.8 mg/ml).</p>	<p>(Pozzo et al, 2004 ; Marsh et al, 2010 ; Amalric et al, 2017).</p>

<p>Méthotrexate (Methotrexate®) <b>(25 mg/ml)</b></p> 	<p>Les antimétabolites</p>	<p>Utilisé dans le traitement de la leucémie et d'autres néoplasies, ainsi qu'en prophylaxie dans les tumeurs cérébrales. Il est aussi utilisé dans le traitement de maladies auto-immunes, des maladies molaires, et des tumeurs trophoblastiques...</p>	<p>Le méthotrexate (MTX) est un agent de la classe des antimétabolites, c'est un analogue de l'acide folique. Il inhibe par compétition la dihydrofolate réductase nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques.</p>	<p>Sa concentration après dilution doit être entre (0.4 – 2.5 mg/ml).</p>	<p><i>(Gaies et al, 2012 ; Charles et al, 2015 ; Amalric et al, 2017).</i></p>
---	--------------------------------	---	---	---	--

## Abstract

The worrying position of cancer as the leading cause of death in the world has led to the development of numerous anticancer agents acting with different mechanisms of action. These drugs, despite their efficacy, have led to the appearance of several side effects whose physiopathological mechanisms are complex and not totally known. Oxidative stress appears to be the most logical and most relevant mechanism for this toxicity. Indeed, the production of reactive oxygen species can lead to oxidation and alteration of lipids, proteins and DNA. In this sense we used three complementary methods based on the contact of a range of anticancer molecules with red blood cells to study the hemolytic potential of these agents on the erythrocytes, to determine their effect on the peroxidation of lipids Membranes, as well as the oxidation of hemoglobin. The results showed that taxotere, holoxan and etoposide have a potential hemolytic effect with a rate of 80.48%; 79.42% and 53.72%, respectively. The effect on lipid peroxidation showed that taxotere and holoxan exert an oxidizing effect on membrane lipids with a value of 0.097 and 0.016, respectively. As for the results of the oxidation of hemoglobin, only etoposide exerted an effect with a value of 0.38. We subsequently proved that some of the molecules used in chemotherapy induce hemolysis of erythrocytes either by lipid peroxidation or by oxidation of hemoglobin.

Key words: Anti-cancer agents, oxidative stress, hemolysis, lipid peroxidation, oxidation of hemoglobin.

## نبذة مختصرة

وقد أدى الوضع المقلق للسرطان كسبب رئيسي للوفاة في العالم إلى تطوير العديد من العوامل المضادة للسرطان تعمل مع آليات مختلفة للعمل. هذه الأدوية، على الرغم من فعاليتها، أدت إلى ظهور العديد من الآثار الجانبية التي الآليات الفيزيولوجية معقدة وغير معروفة تماما. ويبدو أن الإجهاد التأكسدي هو أكثر الآليات منطقية والأكثر صلة بهذه السمية. في الواقع، فإن إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية يمكن أن يؤدي إلى أكسدة وتعديل الدهون والبروتينات والحمض النووي. في هذا المعنى استخدمنا ثلاث طرق تكميلية بناء على اتصال مجموعة من الجزيئات المضادة للسرطان مع خلايا الدم الحمراء لدراسة إمكانات الانحلال لهذه العوامل على كرات الدم الحمراء، لتحديد تأثيرها على بيروكسيد الدهون في الأغشية، وكذلك الأكسدة من الهيموجلوبين. وأظهرت النتائج أن تاكسوتير، هولوكسان و إتبوسيد يكون لها تأثير الانحلال المحتمل بمعدل 80.48%، 79.42% و 53.72% على التوالي. وأظهرت التأثيرات على بيروكسيد الدهون أن تاكسوتير و هولوكسان تمارس تأثير مؤكسد على الدهون الغشائية بقيمة 0.097 و 0.016، على التوالي. أما بالنسبة لنتائج أكسدة الهيموجلوبين، إلا أن إتبوسيد تأثيره بقيمة 0.38. أثبتنا لاحقا أن بعض الجزيئات المستخدمة في العلاج الكيميائي تحفز انحلال الدم من كريات الدم الحمراء إما عن طريق بيروكسيد الدهون أو عن طريق أكسدة الهيموجلوبين.

**الكلمات المفتاحية:** العوامل المضادة للسرطان، الإجهاد التأكسدي، انحلال الدم، بيروكسيد الدهون، أكسدة الهيموجلوبين

## Résumé

La place préoccupante que détient le cancer comme l'une des principales causes de mortalité dans le monde a conduit au développement de nombreux agents anticancéreux agissant avec des différents mécanismes d'action. Ces médicaments malgré leurs efficacités, ont provoqué l'apparition de plusieurs effets secondaires dont les mécanismes physiopathologiques sont complexes et pas totalement connus. Le stress oxydatif semble être le mécanisme le plus logique et le plus relatif à cette toxicité. En effet la production des espèces réactives de l'oxygène peut conduire à l'oxydation et à l'altération des lipides, des protéines et de l'ADN. En ce sens nous avons utilisé trois méthodes complémentaires basées sur la mise en contact d'une gamme de molécules anticancéreuses avec des globules rouges à fin de d'étudier le potentiel hémolytique de ces agents sur les érythrocytes, déterminer leur effet sur la peroxydation de lipides membranaires, ainsi que l'oxydation de l'hémoglobine. Les résultats ont montré que le taxotère, l'holoxan et l'étoposide ont un potentiel effet hémolytique avec un taux de 80,48% ; 79,42% et 53,72%, respectivement. L'effet sur la peroxydation lipidique a montré que le taxotère et l'holoxan exerce un effet oxydant sur les lipides membranaire avec une valeur de 0,097 et 0,016, respectivement. Quant aux résultats de l'oxydation de l'hémoglobine, seul l'étoposide a exercé un effet avec une valeur de 0,38.

Nous somme arrivés par la suite à prouver que certaines des molécules utilisées en chimiothérapie induisent une hémolyse des érythrocytes soit par une peroxydation lipidique ou bien par une oxydation de l'hémoglobine.

**Mots clés :** agents anticancéreux, stress oxydatif, hémolyse, peroxydation lipidique, oxydation de l'hémoglobine.