

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait
éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* sur le
cancer secondaire induit par le cyclophosphamide sur
un modèle animal**

Présenté par :

LAGHA Sarah Ibtissem et SMALI Katia

Soutenu le : 18 Juin 2016

Composition du jury

M. M. HAMOUM	MAB	Président
Mme. M. RAHMANI BERBOUCHA	MAA	Encadreur
Mme. S. BENSALÉM	MCB	Examinatrice

Année Universitaire : **2015/2016**

Remerciements

Nous remercions tout d'abord DIEU, le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience et la volonté pour achever ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice, Mme RAHMANI .M pour son encadrement de qualité, ses conseils, son orientation, sa disponibilité à toute épreuve, et pour la confiance qu'elle nous a accordé,

Nous lui sommes très reconnaissantes d'avoir mis toute sa compétence à notre disposition, pour ses conseils judicieux, sa patience et son suivi régulier à l'élaboration de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Mme AYOUNI.K pour son aide précieuse et sa patience tout au long de ce mémoire.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Mlle BOUGUELID G. pour son aide et précieux conseils dans le laboratoire durant la période expérimentale

Nos sincères considérations et remerciements sont aussi exprimés aux membres du jury :

Mr HAMOUM M. pour l'honneur qu'il nous fait par sa présence en qualité de président du jury et Mme BENSALÉM S. pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Mme ATMANI D pour la confiance qu'elle nous a accordé en nous accueillant au sein du laboratoire de Biochimie Appliquée et pour ses précieux conseils.

Un grand merci à tous.

A l'aide de Dieu tout puissant, J'ai pu réaliser ce travail

Je dédie ce travail à mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Que dieu leur

Prête santé ;

À mes chères sœurs;

À toute ma famille et mes proches ;

À ma chère amie Katia, ainsi qu'à toute sa famille;

A mes très chers amis (es), merci d'avoir été toujours à mes côtés et de

m'avoir soutenu ;

A tous mes amis(es) et camarades de promotion ;

A tous ceux ou celles que je n'ai pas mentionné mais que je n'ai pas oublié.

-Sarah-

À l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

*A mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur
patience, leur sacrifice et leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Que dieu leur
prête santé ;*

A la mémoire de yemma nini,

A mon cher frère Belaid et mes chères sœurs, Nora, Djedjiga et Aldja

A mes chères tantes et mes grands parents

A toute ma famille et mes proches

A mes chères copine Sarah et Amina ainsi qu'à leur famille

A mes chers copines que j'aime beaucoup: Amel, Nawel, Nesrine, Samia, Lyli et Nadia

;

*A mes très chers amis (es) que j'aime beaucoup, merci d'avoir été toujours à mes côtés et de
m'avoir soutenu ;*

A tous mes amis(es) et camarades de promotion Biochimie appliquée

A tous ceux ou celles que j'aime, que je n'ai pas mentionné mais que je n'ai pas oublié.

-Katia-

Liste des abréviations

- 4-OHCP** : 4-hydroxyphosphamide
5-FdUMP : 5-fluorodeoxyuridine monophosphate
5-FU : Fluoro-uracile
6-MP : 6-mercaptopurine
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
ADN : acide désoxyribonucléique
ALP : Phosphatase alcaline
ALT : Alanine aminotransférase
AST : Aspartate aminotransférase
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine-5'-triphosphate
BRCA1 : Breast cancer 1
BRCA2 : Breast cancer 2
CCl4 : Tétrachlorure de carbone
CP : Cyclophosphamide
CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4
DHF : Acide dihydrofolique
DHFR : Dihydrofolate réductase
DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
dTMP : Désoxythymidine monophosphate
dUMP : Désoxyuridine monophosphate
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HGPRT : Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
His : Histidine
IF : Isophosphamide
IL-1 β : Interleukine 1 β
MLH1 : MutL Homolog 1
MN : Micronoyaux
MPA : Mutarde phosphoramide

LISTE D'ABRÉVIATIONS

Msh2 : MutS protein homolog 2

MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

MTX : Méthotrexate

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide.

NMRI : The Naval Medical Research Institute

PGA : 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose

THF : Acide tétrahydrofolique

Thp-1 : Tamm-Horsfall Protein 1

TIMP : Acide thioiosinique

DGA : Acide digallique

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de MTX en haut et de l'acide folique en bas	6
Figure 2 : Cycle de synthèse du dTMP à partir du dUMP	7
Figure 3 : Métabolites issus du cyclophosphamide	10
Figure 4 : Réactions chimiques de MPA avec l'ADN (thérapeutique)	11
Figure 5 : Processus d'alkylation de MPA à l'ADN	12
Figure 6 : Formation d'adduits exo-cycliques de l'acroléine à l'ADN	13
Figure 7 : L'arbuste de <i>Pistacia lentiscus</i>	17
Figure 8 : Les parties végétales de <i>Pistacia</i>	17
Figure 9 : Répartition de <i>Pistacia lentiscus</i> autour du bassin méditerranée	18
Figure 10 : Aire de répartition de <i>Pistacia lentiscus</i> en Algérie	19
Figure 11 : Étapes de préparation de l'extrait éthanolique de graines <i>P. lentiscus</i>	23
Figure 12 : Répartition des animaux au niveau de l'animalerie	24
Figure 13 : Gavage et injections i.p des animaux	26
Figure 14 : Dislocations cervicales, dissection et récupération des fémurs, extraction de la moelle osseuse	26
Figure 15 : Coloration des lames avec le GIEMSA	27
Figure 16 : Représentation graphique des indices mitotiques des groupes témoins négatif (CMC 0.8%).et positifs	30
Figure 17 : Photographie originale des étapes de sacrifice des souris	31
Figure 18 : Différentes types d'aberrations chromosomiques induites par le CP	32
Figure 19 : Effet cytotoxique du CP et des différentes concentrations de l'extrait éthanolique des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> sur les cellules de la moelle osseuse des souris	33

- Figure 20** : Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique des graines *P.lentiscus* à différentes concentrations sur le pourcentage d'AC (sans gap) 34
- Figure 21** : Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique des graines de *P.lentiscus* à différentes concentrations. 34
- Figure 22** : Représentation graphique de l'IM des cellules de la moelle osseuse des souris suite à la Co-administration du CP et l'extrait des graines de *P.lentiscus* 36
- Figure 23** : Représentation de l'activité antigénotoxique (sans gap) des extraits de graines de *P.lentiscus*. 37
- Figure 24** : Représentation de l'activité antigénotoxique (avec gap) des extraits de graines de *P.lentiscus*. 37

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux I : Tableau récapitulatif de différentes mutations, Tolérance, réparation et les conséquences de l'absence de système de réparation.	02
Tableaux II : Quelques composés de plantes médicinales étudiées pour leur activité anticancéreuse.	13
Tableau III : Composés phytochimiques et activités des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .	17
Tableau IV : Fréquences des aberrations chromosomiques des cellules de la moelle osseuse des souris témoins négatif (CMC) et positif (CP).	36
Tableau V : Types et fréquences des aberrations chromosomiques de moelles osseuses de souris traitées par l'extrait éthanolique des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .	40
Tableau VI : Types et fréquences des aberrations chromosomiques de moelles osseuses de souris traitées par l'extrait éthanolique des graines de <i>Pistacia lentiscus</i>) en association avec le cyclophosphamide.	43

LISTE DES ABRÉVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- CANCER ET CHIMIOTHÉRAPIE	2
I.1.1-GENERALITES SUR LE CANCER.....	2
I.1.2-MUTAGÉNICITÉ ET SYSTÈMES DE RÉPARATION	2
I.1.3- CANCÉROGENÈSE	3
I.1.3.1. ACTIVATION DES ONCOGÈNES.....	3
I.1.3.2- GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEURS	3
I.1.3.3- ACTIVATION DES GÈNES CODANT POUR LA TÉLOMERASE.....	4
I.1.4- HISTORIQUE SUR LA NAISSANCE ET LE DEVENIR DES AGENTS ANTICANCÉREUX	4
I.1.5-CHIMIOTHÉRAPIE.....	4
I.1.5.1-CHIMIOTHÉRAPIE CYTOTOXIQUE	4
I.1.5.2- INHIBITEURS DE LA TOPOISOMÉRIASE (ANTI-TOPOISOMÉRIASE).....	7
I.1.5.3-INHIBITEURS DU PROTÉASOME.....	7
I.1.5.4-AGENTS DU FUSEAU MITOTIQUE.....	8
I.1.5.5-AGENTS ALKYLANTS	8
I.1.6-CYCLOPHOSPHAMIDE (CP)	9
I.1.6.1-MÉTABOLISME DU CP ET DE L'IFOSPHAMIDE	9
I.1.6.2-PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DE LA LIAISON DE LA MPA À L'ADN.	11
I.1.6.3--LIAISONS DE L'ACROLÉINE À L'ADN	12
I.1.7- TESTS DE GÉNOTOXICITÉ	13
I.1.7.1- TEST DE AMES.....	14
I.1.7.2-TEST DES COMÈTES	14
I.1.7.3-TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES.....	14
I.2- LE PISTACHIER LENTISQUE (<i>Pistacia lentiscus</i>)	15
I.2.1-GENERALITES	15

I. 2.2- DESCRIPTION DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	17
I. 2.3-TAXONOMIE	18
I.2.4-REPARTITION GEOGRAPHIQUE	18
I.3-ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES ET EFFETS THERAPEUTIQUES DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	19
I.3.1-UTILISATION TRADITIONNELLE	19
I.3.2-ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	19
I.3.3-LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	21

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIEL	24
II.1.1-MATÉRIEL VÉGÉTAL ET EXTRACTION	24
II.1.2-ANIMAUX	25
II.1.3-PRODUITS CHIMIQUES UTILISES	25
II.2-METHODES	26
II.2.1-TRAITEMENT DES ANIMAUX	26
II.2.2-SACRIFICE ET RECUPERATION DES CELLULES DE LA MOELLE OSSEUSE	27
II.2.3-FIXATION DE CELLULES AVEC LA SOLUTION DE CORNOY	28
II.2.4-COLORATION A LA GIEMSA ET FIXATION DES LAMELLES	28
II.2.5-OBSERVATION ET ANALYSE DES LAMES	29
II.2.6-ANALYSE STATISTIQUE	29

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1.RESULTATS.....	30
III.1. ACTIVITE GENOTOXIQUE DU CYCLOPHOSPHAMIDE	30
III.2-EVALUATION DE L'ACTIVITE GENOTIXIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES GRAINES DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	33
III.3-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI GENOTOXIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES GRAINES DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	36
IV-DISCUSSION.....	39
CONCLUSION.....	45
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	47

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La chimiothérapie du cancer est souvent associée au stress oxydatif et la chute des concentrations plasmatiques de divers antioxydants chez les patients traités. Cela peut déclencher divers effets secondaires et certaines toxicités physiologiques, y compris les dommages de l'ADN dans les tissus et le développement de cancer secondaire (**Elsendoorn et al., 2001**). Une des stratégies prometteuses est de réduire le stress oxydant et donc prévenir ou atténuer les effets secondaires précédemment cités (**Singal et al., 2000; Quiles et al., 2002**).

Le cyclophosphamide est un agent alkylant antinéoplasique bifonctionnel de la classe des oxazaphosphorine, appartenant à la famille de moutardes azotées, est largement utilisé dans la chimiothérapie du cancer, il génère des dérivées toxiques principalement : l'acroléine et la moutarde phosphoramidate. Ces derniers engendrent des dommages au niveau de l'ADN qui se traduisent par différents types d'aberrations chromosomiques, conduisant au cancer secondaire (**Anderson et al., 1995**).

Beaucoup d'antioxydants ont été testés pour leurs propriétés protectrices et leur capacité de moduler les effets secondaires des médicaments cytostatiques dans différents modèles expérimentaux (**Slapšytė et al., 2013**).

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques qui ont révélé ses différentes activités à savoir antioxydantes, anti-inflammatoire, cytoprotectrice et notamment anticancéreuse. Ces dernières ont été attribuées au potentiel actif de ses métabolites secondaires incluant les composés phénoliques dont l'acide gallique, digallique, l'acide tannique et la quercétine (**Remila et al., 2015**).

Pour cette étude, l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus*, a été sélectionné afin d'évaluer ses activités génotoxique et antigénotoxique, *in vivo*, sur les cellules de la moelle osseuse de souris via le test d'aberration chromosomique.

CHAPITRE I

*SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I.1-CANCER ET CHIMIOTHÉRAPIE

I.1.1-GENERALITES SUR LE CANCER

Déterminer le processus biologique conduisant une cellule normale de l'organisme à acquérir un phénotype tumorale est l'objectif de son étude. Ce phénotype a été défini par plusieurs caractères, à savoir l'échappement à la mort cellulaire programmée, la perte de l'inhibition de contact, l'invasion tissulaire et développement de métastase et l'échappement au système immunitaire et néo-angiogenèse.

Ces propriétés se traduisent par une séquence d'évènements histologiques, caractérisés par une différenciation tissulaire, un développement de lésions dysplasiques, de tumeurs bénignes, puis de tumeurs malignes, liée à une séquence d'évènements moléculaires (anomalies génétiques), responsables de ces modifications tumorales (Soria *et al.*, 2014).

I.1.2-MUTAGÉNICITÉ ET SYSTÈMES DE RÉPARATION

La mutagenèse est le processus d'apparition d'une mutation, il peut être naturel ou artificiel (par exposition de l'ADN à un agent mutagène). Dans la nature, ce processus peut être à l'origine du cancer, de maladies héréditaires ou d'innovations évolutives et est le principal responsable de la biodiversité des espèces. Le tableau ci-dessous regroupe les différents dommages de l'ADN, leurs sources et les mécanismes de réparation.

Tableau I :Tableau récapitulatif de différentes mutations, tolérance, réparation et conséquences de l'absence de système de réparation(Duval, 2003)

Source du dommage	ERO, Radiations ionisantes, agents alkylants	UV, Cisplatine, hydrocarbure, ERO	Erreurs de réplifications	Agents ionisants, ERO, Agents alkylants, Cisplatine, spo11, endonuclease HO.
Types de dommages	Bases altérées, site abasique, coupure simple brin	Adduits de l'ADN lien intra brins	Mésappariement de bases, insertions, délétions.	Liens interbrins, cassures double brins
Mécanismes de tolérance en réplification	Polymérase <i>Trans</i> -lésionnelles Voie de tolérances aux dommages		Pas de problèmes de réplification	Arrêt de fourche, effondrement de fourche, l'arrivée de la fourche opposée
Mécanismes de réparation	Réparation par excision de bases,	Réparation par excision de nucléotides	Réparation de mésappariement	Recombinaison homologues, jonction des extrémités non homologues
Les conséquences en absence de réparation	Mutations ponctuelles		Mutations ponctuelles, petites insertions et délétions.	Aneuploïdie instabilité du génome

I.1.3- CANCÉROGENÈSE

La division cellulaire est hautement régulée par des gènes spécifiques, à savoir les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Une fois endommagés, ces derniers sont transformés en oncogènes et / ou inhibent les gènes suppresseurs de tumeurs (**Boyland et al., 1956**).

Il existe un ensemble très efficace de processus biochimiques qui identifie, signale et corrige les dommages de l'ADN et contribue ainsi à maintenir l'intégrité du génome cellulaire. Il s'agit des protéines impliquées dans la transmission du signal mitotique, induit par les facteurs de croissance, de la membrane jusqu'au noyau. Quand ce système est défaillant, il apparaît une perturbation de l'équilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire (**Boyland, 1956**). Les trois événements mutagènes-clés de la cancérogenèse sont l'activation d'un proto-oncogène, l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs et l'activation des gènes codant la télomérase.

I.1.3.1- ACTIVATION DES ONCOGÈNES

Les proto-oncogènes sont associés à la prolifération cellulaire ; ils codent des facteurs de croissance cellulaire, des protéines de transduction ou des récepteurs membranaires. Ils sont classés en quatre familles principales : Les protéines kinases, les protéines G, les proto-oncogènes nucléaires et les facteurs de croissance, actifs durant l'embryogenèse et les réparations tissulaires, peu actifs à l'état physiologique. Ils sont activables en oncogènes par mutation sur leur partie codante ou par amplification génique, résultant d'une translocation rapprochant le promoteur et l'effecteur (**Guerrero et al., 1987**).

I.1.3.2- GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEURS

Ils sont associés à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose et à la réparation des lésions de l'ADN. Activables à l'état physiologique, après un dommage à l'ADN. Ils deviennent inactifs par mutation dans les régions codantes, par inhibition de la transcription, par délétion ou aneugènes. Ils sont classés en «gatekeeper» (*p53, APC, Rb*), des gènes de contrôle et de régulation de la prolifération cellulaire, ayant un rôle direct et majeur dans le démarrage du processus tumoral et « care taker» (*MSH2, MLH1, BCRA1, BCRA2*), des gènes de réparation et stabilisation du génome. Ils ont un rôle indirect dans le démarrage du processus tumoral (**Soussi, 2000**). La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale peut être par : activation des gènes codant pour la télomérase.

I.1.3.3- ACTIVATION DES GÈNES CODANT POUR LA TÉLOMERASE

La télomerase, très peu active dans les cellules somatiques adultes, active dans les cellules germinales et dans les cellules embryonnaires, joue un rôle majeur dans la lutte contre la sénescence cellulaire en permettant, par resynthèse en 5', la restauration des télomères. (Adami, 2008; Botta, 2006).

I.1.4- HISTORIQUE SUR LA NAISSANCE ET LE DEVENIR DES AGENTS ANTICANCÉREUX

La découverte empirique de l'action anti-tumorale de certaines substances remonte à une époque ancienne. À l'antiquité, par exemple, on connaissait déjà le rôle favorable des extraits de *Podophyllum* sur les cancers cutanés. Au siècle dernier, l'action de produits arsenicaux sur la leucémie myéloïde chronique et celle de dérivés de l'éthylène-imine sur certaines tumeurs animales ont été démontrées. Cependant, c'est après 1940 et avec les travaux sur les dérivés azotés de l'ypérite que la chimiothérapie moderne a pris son essor (Chauvergne et Hoerni, 2001). Progressivement, l'arsenal chimiothérapique a été enrichi, selon 3 démarches différentes :

- la découverte, due au hasard (certains antibiotiques et dérivés de platine) ;
- la déduction, à partir d'autres actions biologiques (alcaloïdes végétaux, les moutardes azotées et les méthotrexates) ; et
- la recherche rationnelle (notamment certains antimétabolites) (Chauvergne et Hoerni, 2001).

I.1.5-CHIMIOTHÉRAPIE

La chimiothérapie fait référence généralement aux traitements utilisés contre le cancer. Ces derniers sont ainsi appelés agents antinéoplasiques, comme elle peut référer aussi aux médicaments traitant certaines autres maladies non néoplasiques. Ces médicaments peuvent être classés en quatre catégories : les inhibiteurs de l'activité protéine tyrosine kinase, les modificateurs de la réponse immune, les hormones et enfin les agents cytotoxiques, largement utilisés en chimiothérapie.

I.1.5.1-CHIMIOTHÉRAPIE CYTOTOXIQUE

Plus de 100 médicaments chimiothérapiques sont aujourd'hui utilisés, que ce soit seul ou en association à d'autres traitements (chimiothérapie combinée) (Benedict et al., 1977), ou

en chimiothérapie concomitante, qui a pour but l'additivité des effets anti-tumoraux et/ou la potentialisation de l'un des traitements pas l'autre (Vuillet *et al.*, 2014).

Ces médicaments varient selon plusieurs critères à savoir, la composition chimique, le mode d'administration, la spécificité, vis-à-vis, des formes de cancer, les effets secondaires (Sneader, 2005) ou encore selon le timing d'intervention : agents non-spécifiques ou ils agissent à n'importe quelle moment du cycle cellulaire et agents spécifiques, qui agissent à des stades particuliers de la division cellulaire (Shambaugh, 1992). Selon leur mécanisme d'action on distingue : les agents antimétabolites, les inhibiteurs mitotiques (inhibiteurs de microtubule), les inhibiteurs de la topoisomérase II et les agents alkylants.

- **Anti-métabolites**

Les antimétabolites sont des analogues des composés nécessaires à la synthèse, *de novo*, des acides nucléiques. Leur interférence à la molécule d'ADN est beaucoup plus prononcée lors de la phase « S » du cycle cellulaire ; ils inhibent la synthèse de l'ADN et plus accessoirement de l'ARN, en se substituant à eux ou en inhibant les enzymes essentielles à leur synthèse (Shambaugh, 1992; Chauvergne & Hoerni, 2001). On distingue : les purines, les pyrimidines et les antifoliques.

- **Anti-métabolites puriques**, dont on cite le 6-mercaptopurine (6-MP), un analogue thiolique de l'hypoxanthine. Cette molécule agit principalement par la formation des nucléotides : après sa pénétration dans les cellules cible, le 6-MP se transforme en 6-MPRibosyl phosphate (acide thioiosinique = TIMP), par l'intervention de l'enzyme HGPRT (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase) (Chauvergne & Hoerni, 2001).
- **Antimétabolites pyrimidiques**, dont le 5 fluoro-uracile (5-FU), qui inhibe la synthèse des thymidilates et bloque la synthèse d'ADN. Il est métabolisé en fluoxuridine par la thymidine-phosphorylase, puis en fluoro-deoxyuridine-monophosphate sous l'action de la thymidine kinase (5FdUMP). Le 5FdUMP inhibe la thymidilate synthétase enzyme essentielle à la synthèse des pyrimidines. Il peut être aussi triphosphorylé et incorporé de façon erronée dans la chaîne d'ADN, dont il altère le métabolisme et la fonction (Anonyme 1)
- **Antimétabolites anti-foliques** représentés par l'acide folique ou ptéroylmonoglutamique, un élément essentiel dans le cycle de synthèse des bases puriques, où l'acide dihydrofolique, constamment réduit en acide tétrahydrofolique,

grâce à l'enzymedihydrofolate-réductase (DHFR). L'anti-folique va précisément bloquer cette voie et entraîner des perturbations dans la réplication cellulaire. Le méthotrexate, un analogue de l'acide folique est le premier médicament ayant permis des rémissions de leucémies. Cette molécule peut être divisée en 3 parties : une première partie composée d'un cycle ptéridine, une seconde d'un acide para-amino-benzoïque et une dernière d'un acide L-glutamique (Figure01).

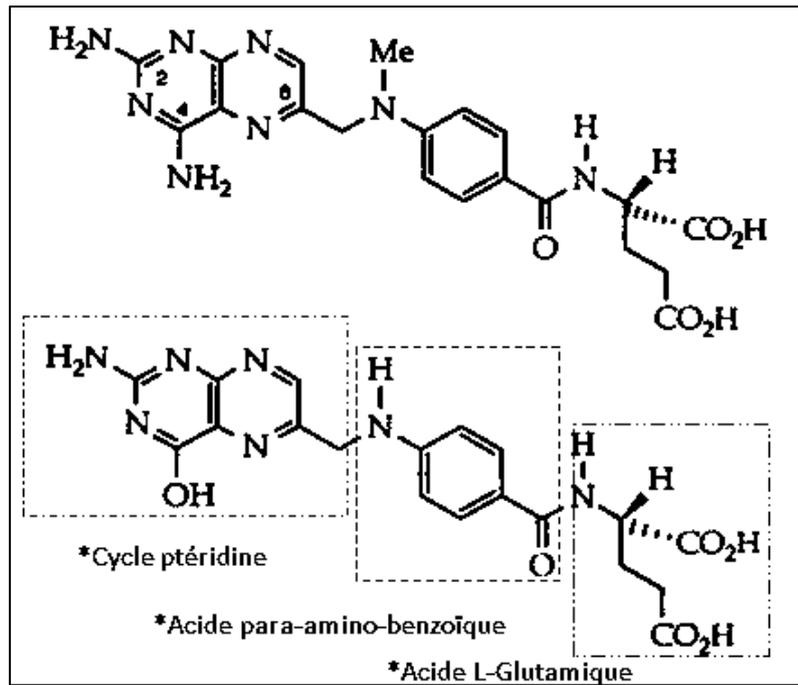


Figure 01 : Structure chimique de MTX en haut et de l'acide folique en bas(Launay, 2013)

Le MTX agit comme faux substrat, en inhibant DHFR de façon compétitive et non spécifique. L'administration d'une forte concentration d'acide folique provoque le déplacement du MTX de ses sites de liaisons à la DHFR et elle retrouve son activité. Physiologiquement, la DHFR est impliquée dans la réduction de l'acide dihydrofolique (DHF ou FH₂) en acide tétrahydrofolique (THF ou FH₄), en présence du coenzyme NADPH, H⁺ lors de la synthèse de la thymidine. Le blocage de la DHFR empêche alors, la régénération du THF et donc du N⁵, N¹⁰-Méthylène-tétrahydrofolate, qui est un cofacteur nécessaire à la transformation du dUMP en dTMP (Figure02)(Vuillet *et al.*, 2014).

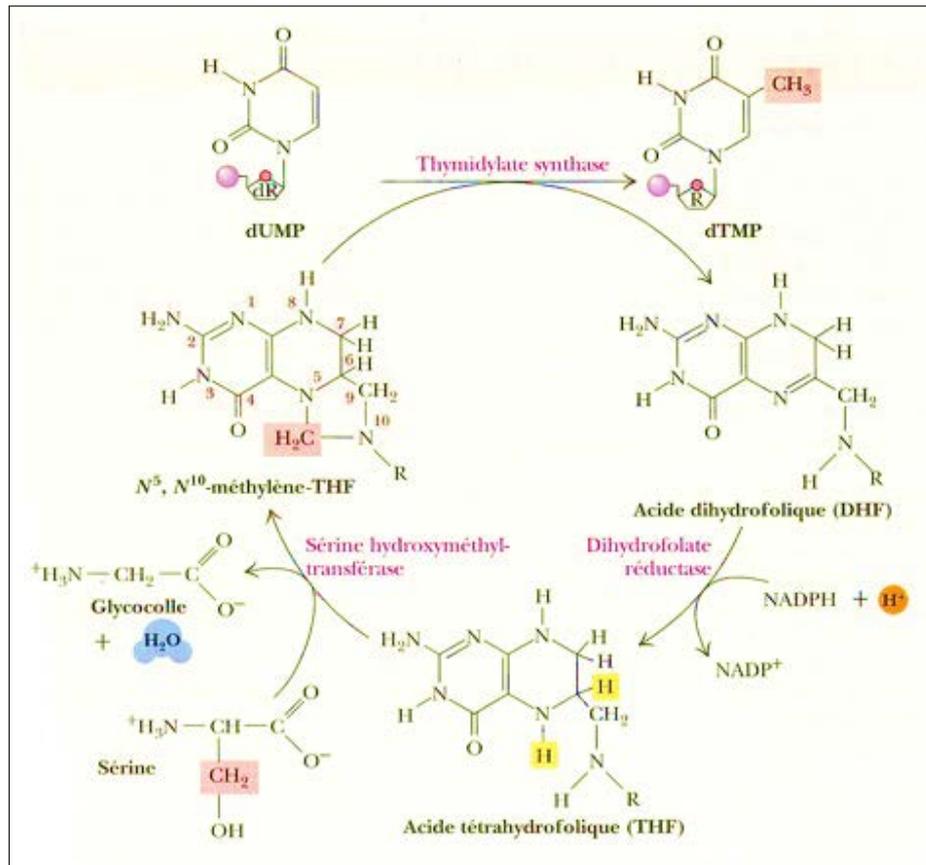


Figure 02 : Cycle de synthèse du dTMP à partir du dUMP(Launay, 2013)

I.1.5.2- INHIBITEURS DE LA TOPOISOMÉRISE (ANTI-TOPOISOMÉRISE)

Ces drogues interfèrent les enzymes appelés « Topoisomérase », qui assurent la séparation des deux brins d'ADN (stabilisants de coupures), aboutissant à l'arrêt de la réplication et l'apoptose. Ils sont scindés en 2 groupes : les Inhibiteurs de la topoisomérase I qu'est un monomère capable d'agir sur un seul brin de la double hélice, et les inhibiteurs de la topoisomérase II, constituée de plusieurs unités d'homodimères, aptes à opérer sur les deux brins de l'ADN(Vuillet *et al.*, 2014).

I.1.5.3-INHIBITEURS DU PROTÉASOME

Le bortézomib est le seul représentant de cette classe médicamenteuse. Cette molécule est spécialement conçue pour inhiber le protéasome 26S, un large complexe protéique qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme des protéines spécifiques. Cette machinerie protéolytique reconnaît et dégrade les protéines, dont la conformation, la structure ou la raison d'être n'est pas conforme aux besoins cellulaires. L'homéostasie étant perturbée, le bortézomib entraîne un arrêt du cycle et la mort cellulaire (Vuillet *et al.*, 2014).

I.1.5.4-AGENTS DU FUSEAU MITOTIQUE

Il s'agit généralement des alcaloïdes de plantes et autres composés issues de produits naturels. Ils bloquent la mitose en phase M du cycle cellulaire, interagissent avec le cytosquelette cellulaire. Ce sont des composés puissants, qui agissent sur les fuseaux de microtubules, issus de la polymérisation de tubulines, en empêchant soit leur construction, soit leur déconstruction. Il s'agit respectivement de poisons et déstabilisants du fuseau. Par ailleurs, cette classe d'anticancéreux est de loin le meilleur exemple de l'utilité de la pharmacognosie en thérapeutique (Vuillet *et al.*, 2014).

I.1.5.5-AGENTS ALKYLANTS

Les agents alkylants sont des produits électrophiles (instables), lipophiles et de très faible poids moléculaire. Ces propriétés leurs permettent de se dégrader rapidement et de se distribuer dans tous les tissus, à travers les membranes physiologiques de manière passive, par conséquent, leur demi-vie est très courte. Leurs distribution dans le système nerveux central est très importante, ils constituent ainsi des médicaments clés dans le traitement des tumeurs cérébrales.

Un agent alkylant est capable d'introduire sur molécule donnée un groupement hydrocarboné, dit "alkyl-", noté : R-CH₂-, selon la réaction suivante :



Cette réaction (alkylation) peut avoir lieu sur plusieurs substrats biologiques, mais la seule alkylation significative en terme d'efficacité anti-tumorale est celle des bases hétérocycliques de l'ADN sur des sites particuliers, à savoir l'oxygène (O) en position 6 et l'azote (N) en position 7 de la guanine, le N3 de la cytosine et le N1 de l'adénine (Soria *et al.*, 2014).

Lorsque l'agent alkylant greffe une seule chaîne « adduit » sur un atome on parle d'un agent alkylant monofonctionnel et lorsqu'il se fixe sur deux atomes potentiels, il est dit bifonctionnel avec, dans le cas des acides nucléiques, formation de ponts intra ou inter-caténaires (Vuillet *et al.*, 2014).

Ces alkylations n'étant pas réparables par les processus naturels de correction, elles provoquent irrémédiablement la mort cellulaire. Si les agents alkylants sont capables de

produire des liaisons avec l'ADN, ils ciblent de façon peu spécifique, les cellules tumorales (Vuillet et al., 2014).

Cette classe pharmacologique est constituée de : Alkylsulfonates, Nitrouées (agissent non seulement par alkylation de l'ADN, mais aussi de l'ARN, et plus notoirement par carbamylation de protéines, Triazènes, Aziridines et Hypoxides, alkylant du sillon mineur de l'ADN et les Moutardes azotées regroupant le Melphalan, le Chlorambucil, la Caryolysine, l'Estramutsine et enfin les Oxazasphorines, dont le Cyclophosphamide.

Les moutardes azotées ont la propriété d'échanger un groupe alkyl, contre un proton mobile d'un groupe réactif de l'ADN, ceci pour créer une à deux liaisons covalentes avec les bases génomiques, d'où leur indication dans le traitement de multiples cancers (Mirkes et al., 1984).

I.1.6-CYCLOPHOSPHAMIDE

Le cyclophosphamide (CP) ou (N, N-bis (2-chloroethyl) tetrahydro-2H-1,3,2-oxaphosphorin-2-amine, 2-oxide monohydrate) est le plus couramment utilisé des produits alkylants, non seulement autant qu'anti-cancéreux en chimiothérapie, mais aussi comme immunosuppresseur depuis 1958. Le CP ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$) est une poudre blanche, fine, cristalline et inodore de poids moléculaire 279.1 g/mol, et de structure formée d'un cycle phosphoramidate lié à une entité bifonctionnelle, avec deux groupements chloroéthyl (Figure 03) (Anderson et al., 1995).

Dans le cas du cancer, le CP est administré par voie intraveineuse à des doses de 600-1000mg/m² chaque 3 à 4 semaine, sa demi-vie est de 5 à 8.2 heures. Sa biodisponibilité est proche de 100% (Moore, 1991), quant à sa distribution seule ≈20% du CP est lié aux protéines, alors que ses métabolites sont plus fortement liées (≈67%). Le volume de distribution est de 0.54 à 1.1 l/kg (Grochow et Colvin, 1979). La clairance corporelle totale moyenne du CP chez les sujets sains est de 5.4 L/h (Sladek et al., 1984).

I.1.6.1-MÉTABOLISME DU CYCLOPHOSPHAMIDE ET L'IFOSPHAMIDE

L'activation principale du CP et l'IF (isophosphamide) se déroule au niveau du foie par des enzymes oxydases multiples du CYP p450 3A4, produisant le 4-hydroxyphosphamide (4-OHCP)/aldophosphamide (Figure 03), qui sont délivrées aux cellules néoplasique par la circulation sanguine (Alarcon et al., 1972).

Le 4-OHCP peut subir une réaction d'oxydation par l'aldéhyde déshydrogénase pour donner le 4-keto-CP (non toxique)(Brad *et al.*, 1985), comme il subit aussi une réaction spontanée donnant l'aldophosphamide, qui donnera par la suite le carboxyphosphamide qui lui-même n'est pas toxique, mais peut augmenter la concentration de la moutarde de nornitrogen un agent alkylant puissant à pH bas. D'un autre côté l'aldophosphamide subit une réaction spontanée de β -oxydation générant deux métabolites en quantités équimolaires, à savoir la moutarde phosphoramide et l'acroléine (Figure 03) responsable des effets indésirables (Marinello *et al.*, 1984 ; Anderson *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 1991).

D'autres métabolites cytotoxiques mineurs sont le chloracétaldehyde (produit par N-oxydation du CP), et la moutarde nornitrogen (produite par clivage enzymatique du résidu phosphamide du carboxyphosphamide) (Marinello *et al.*, 1984; Moore *et Erlichman*, 1998).

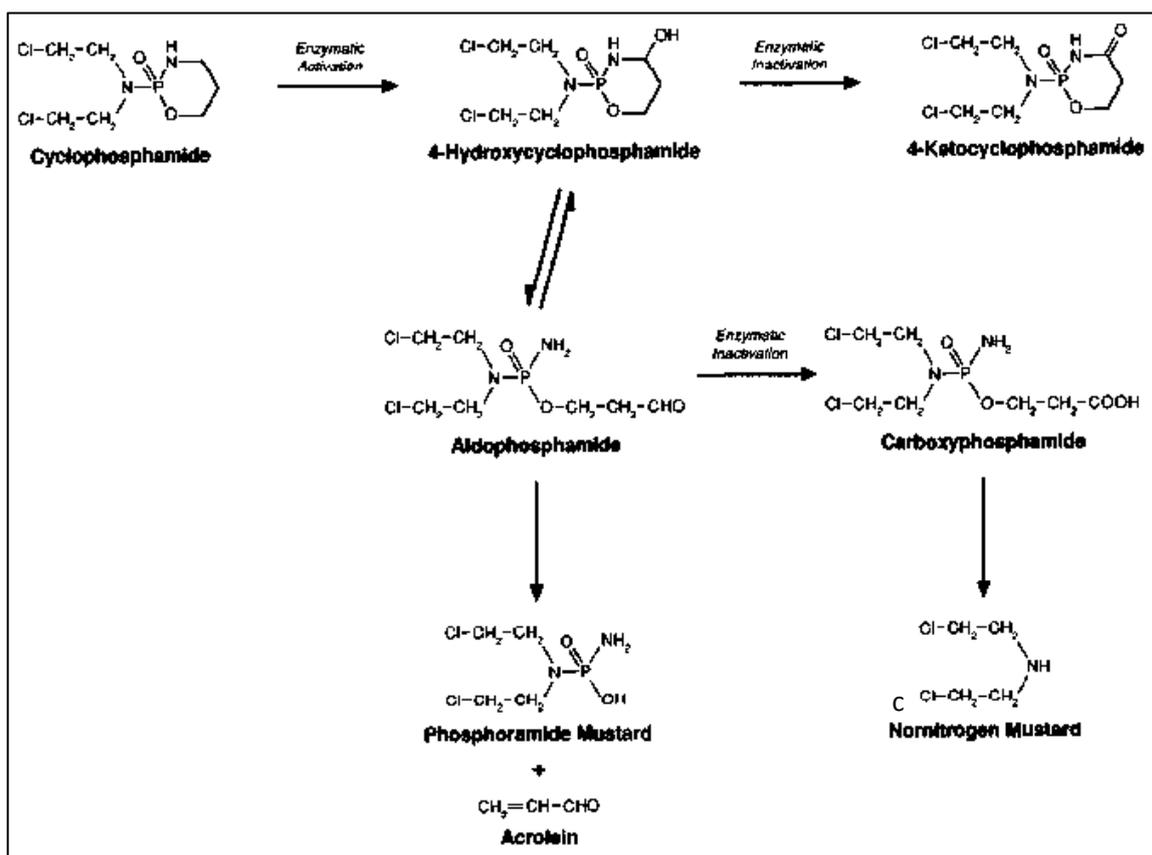


Figure 03 : Métabolites issus du cyclophosphamide (Anderson *et al.*, 1995).

La sélectivité du CP, vis-à-vis, les cellules cancéreuses peut être relié premièrement à la stabilité du 4-OHCP, à pH physiologique, ce qui lui permet de transporter la MPA

réactive (Wrabetz *et al.*, 1980) et à la faible activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase, comparé aux cellules normales; l'oxydation (détoxification) du 4-OHCP en 4-keto-CP, afin de l'éliminer par excrétion (Anderson *et al.*, 1995; Le Blanc & Waxman, 1989; Wrabetz *et al.*, 1980).

La connaissance des modes de formation des adduits peut aider à l'optimisation de la thérapie et détecter les différences interindividuelles du métabolisme et de l'excrétion du médicament (Harris, 1985). En plus elle peut servir aussi dans l'amélioration des thérapies combinées et la réduction des effets secondaires, par la co-administration d'antioxydants. Ainsi au niveau de l'activité génotoxique du CP, résultat de l'activation métabolique de la MPA hautement réactive, qui subit une cyclisation intramoléculaire pour former un 1^{er} ion aziridium, hautement électrophile, qui se lie préférentiellement à l'azote-7 de la guanine expliqué par le potentiel moléculaire électrostatique de l'ADN (Kohn, Hartley, & Mattes, 1987) (ou autre nucléophile cellulaire). Ce processus se répète pour une seconde réaction d'alkylation (figure 04) (Colvin & Quong, 2002), conduisant à un blocage de la réplication de l'ADN, il sont ainsi considérés les molécules responsables de l'action cytotoxique (Crook, Souhami, & Mclean, 1986).

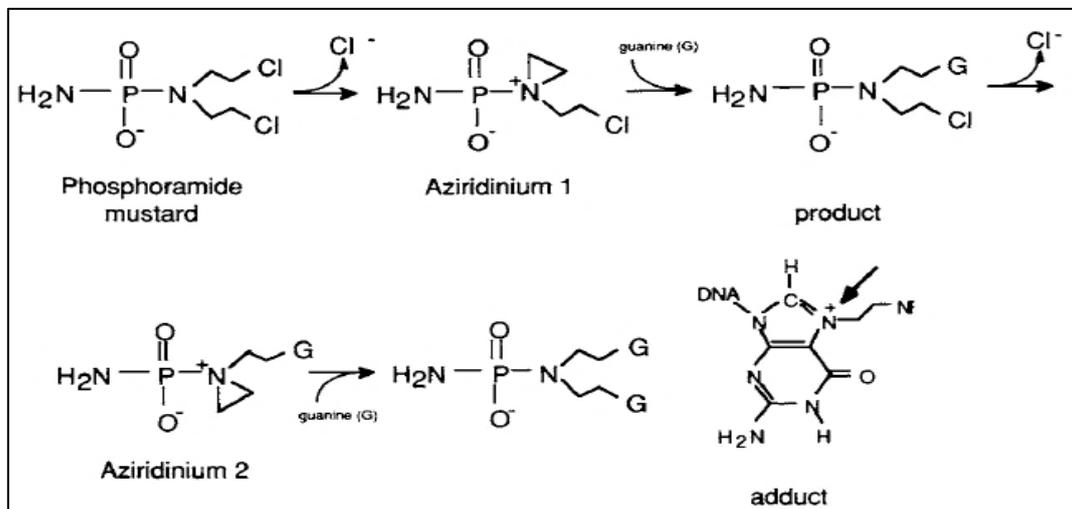


Figure 04 : Réactions chimiques de MPA avec l'ADN (thérapeutique) (Colvin & Quong, 2002).

I.1.6.2-PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DE LA LIAISON DE LA MPA À L'ADN

La réaction d'alkylation par MPA et les structures sont expliquées dans la figure 05 (a), (b) et (c), qui montrent les 3 premières formes d'alkylation initiée par la réaction de la molécule active de la moutarde phosphoramidate avec l'ADN. Les structures (d) et (e) montrent la mono alkylation finale avec liaisons intra-brins qui pourrait être à l'origine des mutations

d'ADN et la carcinogenèse, (f) et (h) pourraient quant à elle être responsables de la cytotoxicité thérapeutique par liaisons interbrins(M. E. Colvin & Quong, 2002).

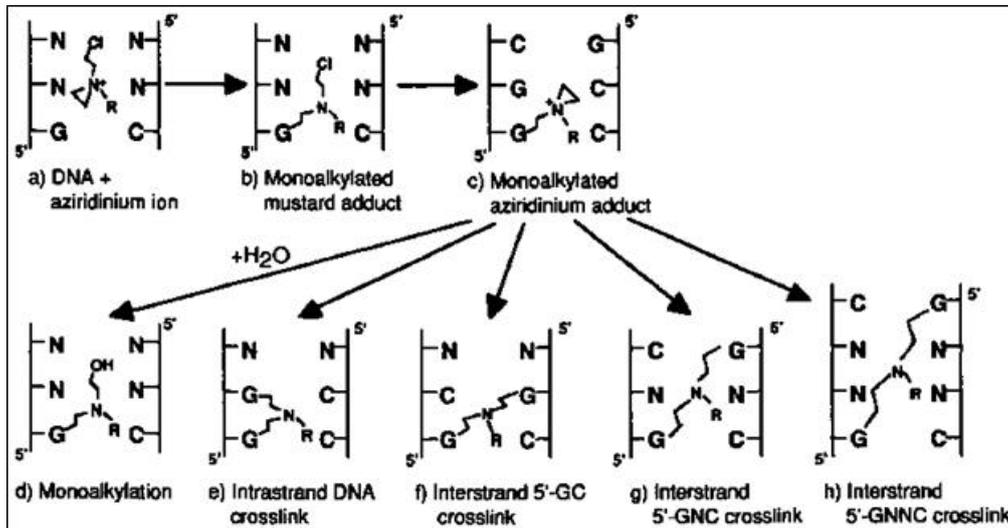


Figure 05 : Processus d'alkylation de MPA à l'ADN(Colvin & Quong, 2002)

I.1.6.3. -LIAISONS DE L'ACROLÉINE À L'ADN

Dans le cancer de la vessie traité par le CP, la cystite hémorragique qu'est l'effet indésirable le plus fréquent n'est pas observé après le traitement avec des analogues du CP, qui ne sont pas métabolisés en acroléine. Cette dernière, synthétisé en quantités équimolaires que la MPA, étant hautement toxique peut être responsable donc de cet effet secondaire toxiques parmi d'autres (Cox, 1979).

En effet l'acroléine est hautement réactive, elle se lie aux protéines et aux peptides ayant des groupement sulfhydryle, par des liaisons conjuguées de façon à épuiser les molécules nucléophiles (glutathion)(Kehrer & Biswal, 2000), conduisant à des ruptures au niveau des processus métaboliques, à des altérations de prolifération et du transport membranaire (Patel & Block, 1985).

De plus, en se liant à l'ADN l'acroléine forme des adduits exo-cycliques stables avec les bases nucléiques, associées à la formation de cancer secondaire(Figure 05) (Colvin & Quong, 2002).

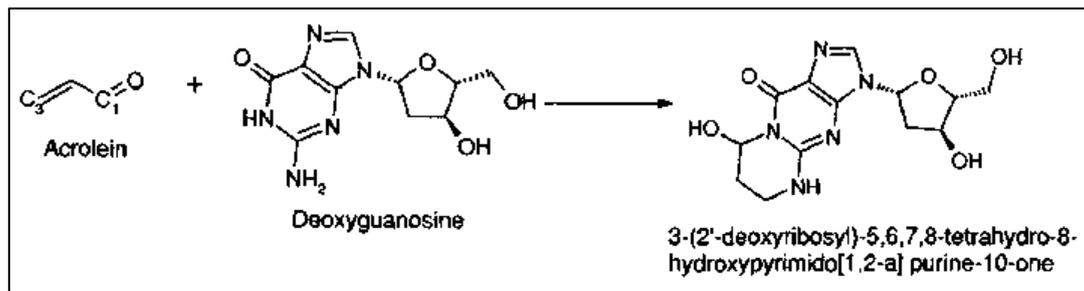


Figure 06 : Formation d'adduits exo-cycliques de l'acroléine à l'ADN (Colvin & Quong, 2002).

L'acroléine avec le désoxycytidine, le désoxyadenine, le désoxythymidine et le désoxyguanosine forme des adduits stables. L'étude, *in vitro*, a suggéré que le désoxyguanosine est le plus pertinent des adduits, et que sa mutagénicité a été démontrée chez les souches *Salmonella typhimurium* (Eder et al., 1990) et chez les cellules ovarienne de mammifères (Foiles et al., 1990). Face à cette cytotoxicité, la cellule présente une certaine résistance par l'activation d'un mécanisme d'excision enzymatique (Colvin, 1999).

L'IF subit un métabolisme similaire à celui du CPA et produit des molécules analogues. Toutefois, sa déchloroéthylation donne le chloracétaldehyde, responsable d'une neurotoxicité (Nau et al., 1982). Certains de ces métabolites peuvent subir des biotransformations conduisant à leur inactivation. Les composés 4-hydroxy et aldophosphamide sont inactivés par l'intermédiaire de l'aldéhyde déshydrogénase (oxydation) et les produits issus de cette réaction sont éliminés dans les urine (Russo et al., 1989). L'utilité clinique des moutardes azotées en général, et le CP en particulier est touchée par leurs effets secondaires indésirables, incluant le cancer secondaire dû à leurs génotoxicité (Eder et al., 1990).

I.1.7- TESTS DE GÉNOTOXICITÉ

Les agents génotoxiques sont de nature physique ou chimique synthétisés au laboratoire. Ils provoquent l'apparition de lésions irréversibles au niveau de l'ADN, et peuvent conduire à des mutations du matériel génétique.

Les tests de génotoxicité visent à mettre en évidence des altérations, pouvant conduire, si les lésions génotoxiques ne sont pas efficacement réparées par les systèmes enzymatiques adéquats, à des mutations. Ils détecteront donc principalement les lésions de l'ADN et/ou des chromosomes ou ses conséquences (effets phénotypiques de mutations géniques). Ils ne visent

pas à détecter directement des cellules cancéreuses, mais des cellules normales ayant subi une atteinte ou agression génotoxique.

I.1.7.1- TEST DE AMES

Il est utilisé afin de déterminer la mutagénicité et l'anti-mutagénicité à court terme de certains agents et mélanges mutagènes (test de mutagenèse) (Czeczot *et al.*,1990).Ce test consiste à examiner, si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques (délétion, substitution et addition) chez différentes souches de *Salmonella typhimurium* qui sont auxotrophe pour l'histidine (His). Les cellules mutantes retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu sans histidine, induisant ainsi une réversion de la mutation au niveau de la souche testée et elle devient (His⁺). Cette capacité augmente en exposant les bactéries du test à des agents mutagènes(Sierra & Gaivão, 2014).

I.1.7.2-TEST DES COMÈTES

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose. Il permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique et indirectement, lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou lors de processus secondaires de défragmentation de l'ADN, tels que l'apoptose.

- L'ADN relâché, est soumis à une électrophorèse, puis révélé par addition d'un intercalant fluorescent (le Bromure d'éthyldium).
- Si l'ADN n'a pas été endommagé (reste sous forme super enroulé) et sera révélé sous forme d'une sphère compacte.
- Si l'ADN a été endommagé, celui-ci présentera en plus des fragments simples et doubles brins (plus légers), qui migreront en dehors de cette sphère formant un "halo" d'ADN, qui s'étirent en direction de l'anode et décrivent la queue de la comète(Sierra & Gaivão, 2014).

I.1.7.3-TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Ce test se base sur la mise en évidence des différentes aberrations chromosomiques (gap) vide, anneau (ring), délétion/fragmentation,(Bouraoui *et al.*,2011) polyploïdie ou encore pulvérisation, induites au niveau des cellules de la moelle osseuse des souris (rongeurs), par un agent mutagène. Ces aberrations sont détectable, sous microscope optique à

la 1^{re} division en bloquant les cellules en métaphase avec la colchicine (inhibiteur de fuseau) (Sierra & Gaivão, 2014).

L'utilité clinique de moutardes azotées est affecté par leurs effets secondaires incluant le cancer secondaire (Eder et al., 1990). C'est pourquoi la recherche scientifique s'est orientée vers la recherche des molécules actives, à effet thérapeutique à partir des plantes.

I.2- LE PISTACHIER LENTISQUE (*Pistacia lentiscus*)

I.2.1-GENERALITES

Depuis très longtemps, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés des plantes, qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments (François, 2010).

La recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur la répartition des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, puis par des études photochimiques et pharmacologiques (Kastamonu et al., 2012).

Ces plantes médicinales sont caractérisées par leur richesse en principes actifs et en substances telles que les polyphénols et les flavonoïdes... qui sont dotées des propriétés importantes et différentes, qui se sont avérés pour exercer des effets biologiques divers, y compris les effets antioxydants, anti-inflammatoires et l'anticancéreux

Les produits naturels représentent un potentiel pour la médecine, en offrant une source de nouvelles structures non accessibles par la synthèse combinatoire. La "nature" a offert et capable de produire des molécules complexes avec des centres chiraux multiples qui peuvent agir sélectivement sur l'un ou l'autre des systèmes biologiques (Manallah, 2012).

La thérapeutique a développé plusieurs types de médicaments, qui agissent en stoppant la prolifération excessive des cellules cancéreuses et interviennent à différents stades de développement des cancers : certains médicaments empêchent les cellules cancéreuses de se multiplier en bloquant leur division cellulaire, d'autres réorientent la cellule vers une « mort naturelle », l'apoptose, d'autres inhibent la création de nouveaux vaisseaux destinés à alimenter la tumeur (néo-angiogenèse) (Matthieuet al.,2013).

Le tableau ci-dessous illustre quelques plantes médicinales étudiées pour leurs activités protectrice ou réparatrice des cancers.

Tableau II : Quelques composés de plantes médicinales étudiées pour leur activité anticancéreuse

Plante	Composés actifs	Activité	Référence
Extrait méthanolique de branche de <i>Ledumgroenlandicum Retzius</i>	Triterpène (l'acide ursolique)	Activité anticancéreuse (Cancer du côlon et cancer de poumon)	(Dufour, 2006)
<i>Curcuma longa</i>	Curcumine (diferuloylmethane)	Suppression de la prolifération et induction de l'apoptose (Cancer de colon, cancer du pancréas)	(Aggarwal et al., 2004)
extraits de feuilles et de galles de <i>Guierasenegalensis</i>	Flavonoïdes, tanins et coumarines	Activité antiproliférative (Cancer de colon)	(Kouamé et al., 2009)
<i>PeltatumPodophyllum</i>	Podophyllotoxine	Arrêt de cycle cellulaire et inhibition de polymérisation de tubuline (cancer du poumon, tumeurs génital)	(Zaid et saad, 2013)
Extrait de feuille de <i>Moringaoleifera</i>	Acide phenoliques et flavonoïdes	Antioxydante et protectrice via l'induction d'une cytotoxicité urinaire de vessie par le cyclophosphamide chez les rats, en mesurant le paramètre de peroxydation lipidique et malondialdéhyde avec l'activité de l'enzyme antioxydante qui réduit le glutathion.	(Taha et al., 2015)
Extrait de <i>Glycyrrhizaglabra</i>	Flavonoïdes, Tannins	Potentiel protecteur contre le cyclophosphamide	(Sharma & Agrawal, 2015)
<i>Taxusbrevifolia</i>	Paclitaxel (Taxol)	Interfère avec la croissance des cellules cancéreuses et ralentit leur croissance et leur propagation dans le corps. Cancer des ovaire	(Zaid et saad, 2013)

Dans le but de rechercher d'autres substances naturelles, à effet anticancéreux ou à effet protecteur, vis-à-vis, des molécules chimiques utilisées en chimiothérapie, *Pistacia lentiscus* est une plante médicinale très répandue en Algérie et en Kabylie et très utilisée dans cette région contre diverses maladies.

I.2.2- DESCRIPTION DE *PISTACIA LENTISCUS*

Pistacia lentiscus (Pistachier lentisque), est appelé « Darou » en arabe local et « Amadagh » dans la région de la Kabylie (Algérie) et le fruit se dénomme *Tidekt* (Hammiche, 2015), appartient à la famille des Anacardiaceés. Il s'agit d'un arbrisseau vivace de trois mètres de hauteur (Figure 07), ramifié, à odeur de résine fortement âcre (Lei et al., 2014).

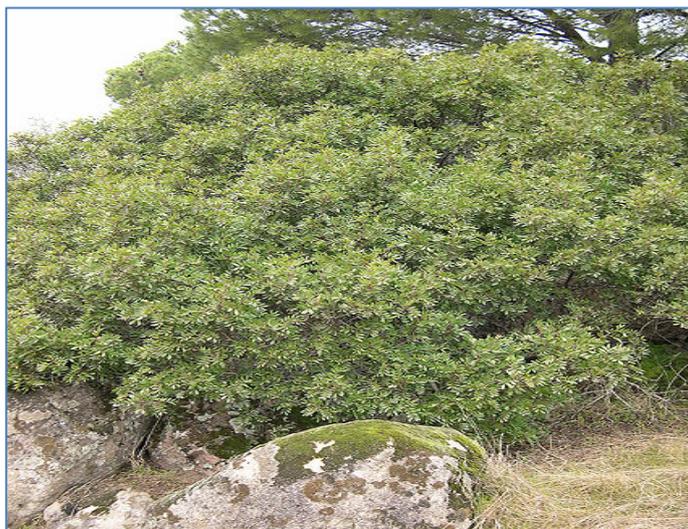


Figure 07 : Arbuste de *Pistacia lentiscus*(Aliouane et al., 2012)

Le pistachier lentisque est caractérisé par une écorce, rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand on incise l'écorce la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée à odeur forte (mastic) (Figure 08a), les branches tortueuses et pressées, forment une masse serrée. Les fleurs qui sont unisexuées d'environ trois mm de large se présentent sous forme de grappe (Figure 08b) (Yaniv & Dudai, 2015), Quant au fruit, c'est une baie globuleuse [de 2 à 3 mm], (Figure 08c) monosperme, remplie par le nucléole de la même forme, d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité, qui est complète à l'automne. (Rameau et al., 1989).



Figure 08 : Parties végétales de *Pistacia*(Aliouane et al., 2012)

I.2.3-TAXONOMIE

La taxonomie de l'espèce est présentée ci-dessous :

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous-classe : Dialypétales

Série : Disciflores

Sous-série : Diplostémones (Katsiotis, *et al.*, 2003)

Ordre : Térébinthales ou Sapindales

Famille : Térébinthaceae

Genre : *Pistacia*

Genre-espèce : *Pistacialentiscus*(AL-Saghir & Porter, 2012)

I.2.4-REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Pistacia lentiscus est un arbrisseau que l'on trouve couramment en sites subhumide, semi-aride et arides, sur le pourtour méditerranéen de l'Europe, d'Afrique et d'Asie, jusqu'aux Canaries et au Portugal) (Figure 09) (Lei *et al.*, 2014)



Figure 09 : Répartition de *Pistacia lentiscus* autour du bassin méditerranéen (Lei *et al.*, 2014).

En Algérie, *Pistacia lentiscus* occupe l'étage thermo-méditerranéen. Sa limite méridionale se situe aux environs de Saida, quant à sa présence au sud de l'Atlas saharien n'est pas signalée. On le retrouve sur tout type de sol, dans l'Algérie subhumide et semi-aride, dans le bassin du Soummam, elle est en association avec l'Oléastre (olivier sauvage) le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Quezel *et al.*, 1962).

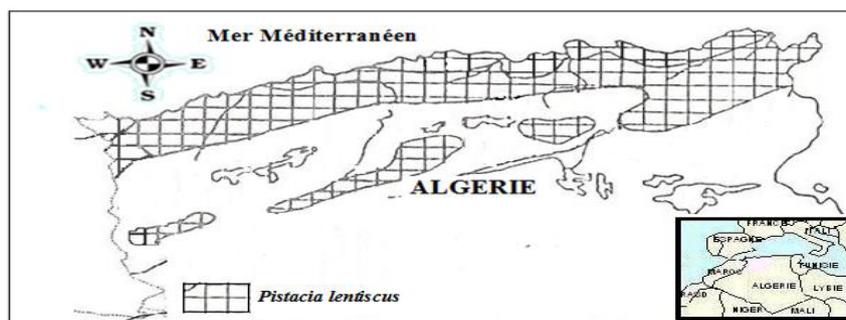


Figure 10: Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* en Algérie (Quezeletal., 1962).

I.3- ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES ET EFFETS THERAPEUTIQUES DE *PISTACIA LENTISCUS*

I.3.1-UTILISATION TRADITIONNELLE

La partie aérienne de *P. lentiscus* a été traditionnellement employée comme stimulant diurétique dans le traitement de l'hypertension, la toux, les maux d'estomac et la sinusite (Cheurfa & Allem, 2015).

Les médecines traditionnelles, pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, des plaies et l'huile grasse obtenue par expression des fruits du lentisque est utilisé dans le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes (Acheheb et al., 2012).

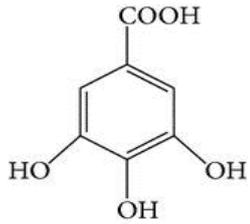
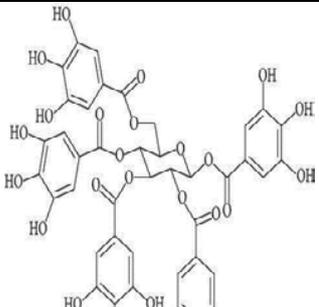
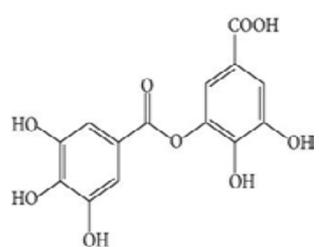
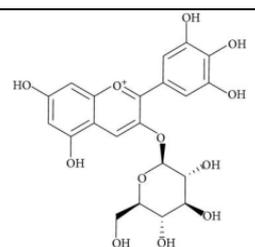
L'huile est aussi employée par voie orale contre les problèmes respiratoires (la bronchite, l'asthme), d'origine allergique et les ulcères de l'estomac. Elles sont également utilisées dans le traitement de l'eczéma, les infections buccales, les diarrhées, les lithiases rénales, la jaunisse et les maux de tête (Ali-Shtayeh et al., 2000; Lev et Amar, 2002).

I.3.2-ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *PISTACIA LENTISCUS*

Plusieurs études ont été mené pour la quantification et l'identification de multiples constituants de différentes classes chimiques, telles que des flavonoïdes, des anthocyanines, des acides phénoliques (acide gallique, acide digallique)(Azaizeh et al.,2013),des triterpénoïdes et des tannins (Remila et al., 2015). Ces constituants sont responsables de l'activité anti-oxydante et différentes propriétés pharmacologiques, y compris hépatoprotectrice, antiulcéreuse, anti-inflammatoire, cytoprotectrice et activité hypocholestérolémique (Lei et al., 2014) antimicrobienne, antifongique et anticancéreuse (Benhammou et al.,2008).

Le tableau suivant représente les différents métabolites secondaires des fruits de *Pistacia lentiscus*, ainsi que leurs activités biologiques

Tableau III : Composés phytochimiques et activités des graines de *Pistacia lentiscus*

Composé	Structure	Activités	Mécanismes proposés	Références
Acide galique		Antioydanste et antimutagène Anticancéreux	Capter le radical Inhiber la xanthine oxydase. Protéger contre la peroxydation lipidique induite par H ₂ O ₂ . Bloque le cycle cellulaire en phase I	(Abdelwahed et al., 2007) Senapathy et al, 2011) (Serrano et al., 1998)
1,2,3,4,6-Pentagalloyl glucose		Antioxydante et antimutagène	Protection contre la peroxydation lipidique induite par H ₂ O ₂	(Abdelwahed, et al., 2007)
Acide digallique		Antioxydanteant igenotoxique anticancéreux	Scavenger de radical Protection contre la peroxydation de lipide. Induction de l'apoptose en activant la voie caspase-8 extrinsèque. Caspase-3 d'une manière dose-dépendante.	(Bhouri et al., 2010; Soleas et al.,2002 ;Ho et al., 2013)
Delphinidin-3-O-glucoside		Antioxydante	Piégeage des radicaux libres	(Longoet al., 2007)

I.3.3-LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE *PISTACIA LENTISCUS*

Plusieurs études ont mis en évidence une variété d'activités des différentes parties de *P.lentiscus*, on cite ;

- **Activité antioxydante**

L'utilisation traditionnelle de la résine de *P.lentiscus* contre la jaunisse a suscité la recherche sur les propriétés antioxydantes de *P.lentiscus*, vu que les maladies du foie ont à l'origine un stress oxydatif important. L'extrait aqueux de *P.lentiscus* a montré l'inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat de foie des rats (**Yaniv & Dudai, 2015**).

L'activité antioxydante démontrée par le test DPPH et le FRAP a été très élevée pour l'extrait méthanolique de la plante (**Atmani et al., 2009**). La capacité de piégeage des radicaux libres la plus efficace a été attribuée aux composés flavoniques et des dérivés galloyls, au niveau des feuilles ainsi qu'à l'acide gallique et digallique, trouvés principalement au niveau des fruits (l'acide digallique a révélé une activité anti-radicalaire importante pour le radical de l'ABTS⁺ à 99% et une protection jusqu'à 68%, vis-à-vis, de la peroxydation lipidique, induite par le H₂O₂ (**Remila et al., 2015; Beghlal et al., 2016**).

- **Activité anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* à une concentration de 100 µg/ml a été démontrée, en mesurant la sécrétion de l'IL-1β par des macrophages exposés à l'ATP ou H₂O₂ (**Remila et al., 2015**)

- **Activité antiulcéreuse**

L'évaluation pharmacologique des extraits de *P.lentiscus* a montré une activité antiulcéreuse du mastic du tronc de cette plante, en réduisant l'intensité de la muqueuse gastrique à une dose orale de 500 mg/kg. Cette activité a été révélée en utilisant les extraits de feuilles de cette plante (**Dellaiet al., 2013**).

- **Activité cytoprotective**

L'évaluation de la cytotoxicité était effectuée, en utilisant l'analyse de MTT en incubant des cellules en l'absence et présence des échantillons examinés. Les extraits bruts *P.lentiscus* ont démontré un effet cytoprotecteur significatif, avec une protection maximale à

100µg/ml. Les extraits de fruit de *P.lentiscus* n'ont montré aucun effet cytotoxique sur la lignée cellulaire Thp-1, tandis que les extraits de feuille induisent une diminution significative de la viabilité de cellules aux concentrations élevées (75 et 100 µg/ml)(**Remila et al., 2015**).

- **Activité hépatoprotectrice**

Les observations après administration orale de l'extrait aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus*(bouillis et non bouillie)à des rats, intoxiqués par un mélange de CCl₄ et de l'huile d'olive, par voie intrapéritonéale, ont démontré que cet extrait exerce une activité anti-hépatotoxique, en réduisant l'activité des trois enzymes hépatique (phosphatase alcaline (ALP),alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST)) et le taux de bilirubine dans le sang (**Janakat et Al-Merie, 2002**)

- **Activité anticancéreuse**

Les différents extraits de *Pistacia lentiscus* bloquent la prolifération cellulaire et induisent l'apoptose des cellules tumorales colorectales humaines ,*in vitro* (**Balan et al., 2007**). Ils exercent un effet cytotoxique contre la leucémie promyélocytaire et inhibent l'apoptose normal des leucocytes polymorphonucléaires oraux (**You et al., 2010**). La résine de *P.lentiscus* a ralenti la croissance des tumeurs colorectales développées à partir des cellules cancéreuse humaines xenogreffées dans des souris. Ils ont également augmenté l'expression du maspin (un inhibiteur de protéase sérique avec une activité suppressive de tumeur) dans les cellules cancéreuse de prostate et ont bloqué la progression de cycle cellulaire. Ces extraits ont également démontré une inhibition significative de la croissance de tumeur des souris immunocompétentes, sans signes de toxicité, liés à l'induction d'apoptose, réduction de neovascularisation et l'inhibition de l'expression de chemokine (**Magkouta et al.; 2009**).En outre, elle a révélé un effet antiproliférative et proapoptotique sur les cellules humaines de leucémie et a empêché le dégagement du facteur endothélial vasculaire de croissance de ces cellules. Une étude,*in vivo*, a prouvé que la dose élevée de l'extrait de *P.lentiscus* a favorisé le développement de lésions préneoplastique dans le foie des rat avec l'augmentation du poids relatif de foie, ce qui a proposé que des effets anticarcinogéniques souhaitables pourraient être obtenus aux doses relativement basses (**Giaginis & Theocharis, 2011**)

- **Activité génotoxique et antigénotoxique**

Les différents extraits de fruit du *P.lentiscus*, présentent un effet inhibiteur significatif indiqué sur la mutagénicité démontré par des études, *in vitro*. L'acide digallique, et le 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose, quantifié dans les fruit de *P.lentiscus* ont présenté une activité antimutagénique analysée par le chromo test SOS, en utilisant *Escherichia coli* PQ37, comme

une souche d'essais, et le test de comète sur la lignée cellulaire, K562 de leucémie chronique myéloïde humaine, après exposition à 800 µg/ml de l'acide digallique et 250 µg/ml de PGA, pour 24 h (**Abdelwahed et al., 2007**).

L'acide digallique obtenue par le fruit de *Pistacia lentiscus* a présenté une activité inhibitrice contre le nitrofrantine et B[a]P : (action mutagène indirect) mutagène induisant la genotoxicité testé aussi par le chromotest SOS (**Bhourri et al., 2012**).

L'objectif de travail est l'évaluation des activités génotoxique et anti-génotoxique de l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus*, par le test des aberrations chromosomiques, induit par le cyclophosphamide, un agent alkylant , utilisé en chimiothérapie.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II-1-MATERIEL

II.1.1-MATÉRIEL VÉGÉTAL ET EXTRACTION

Les fruits de *Pistacia lentiscus* ont été récoltés en mois de décembre 2015, dans la région de Berbacha, Bejaia, Algérie. Elles ont été séchées à l'étuve à une température de 37° C, puis grossièrement broyées, à l'aide d'un broyeur électrique (Kika Labotechnic). La pâte obtenue est, par la suite utilisée, pour l'extraction. Les étapes d'extraction sont illustrées par le diagramme suivant (Figure 11).

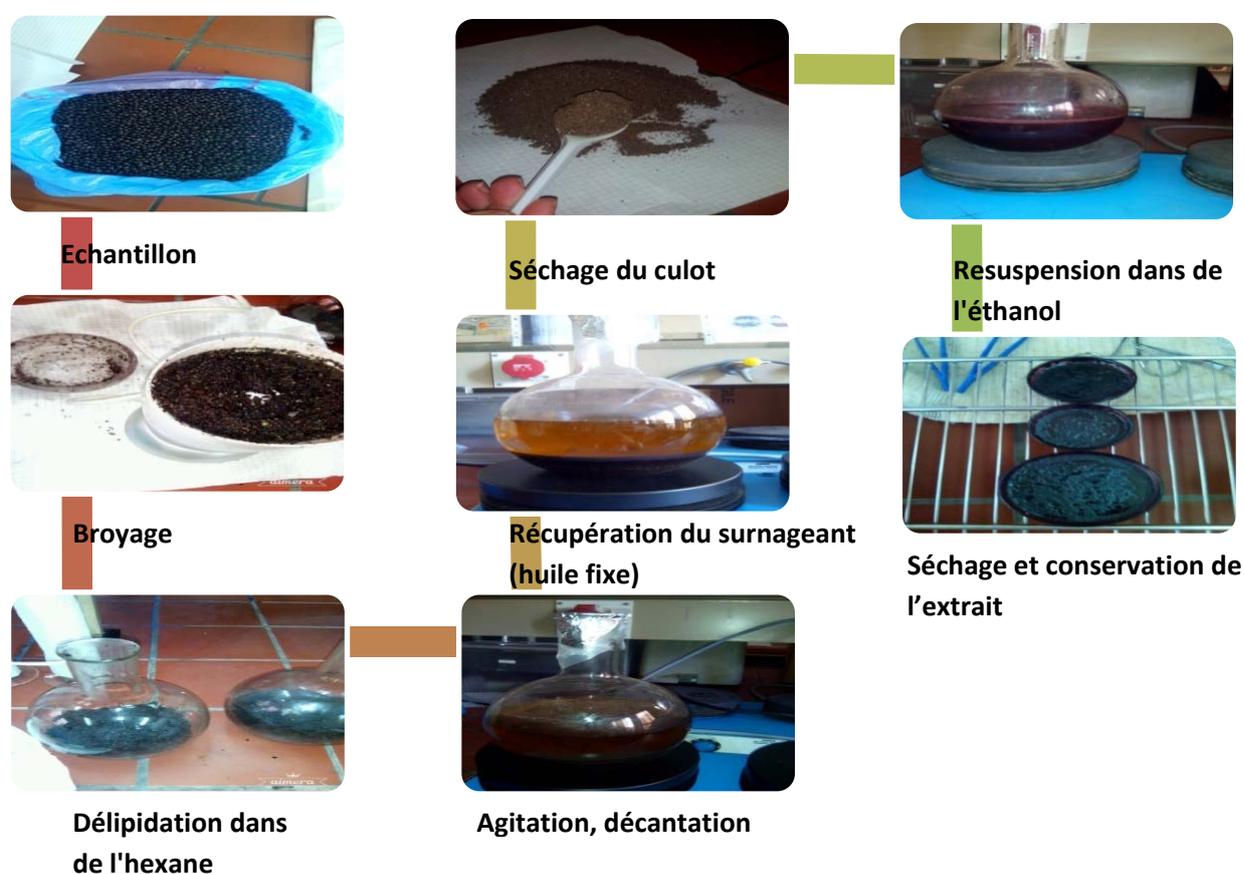


Figure 11 : Étapes de préparation de l'extrait éthanolique des graines *P. lentiscus*.

II.1.2-ANIMAUX

Des souris de type NMRI (mâle et femelle) ont été utilisées dans cette étude. Elles ont été sélectionnées, selon leurs âges (de 6 à 10 semaines) et leur poids (26 - 36 g).

L'élevage a été effectué au niveau du laboratoire d'expérimentation animale de l'université de Bejaia, à partir de souris obtenues de l'institut Pasteur, Kouba, Alger.

Les animaux d'expérimentation ont été maintenus dans une salle à température ambiante, de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ et un cycle de lumière/obscurité 12H/12H, avec libre accès à l'eau potable et à une nourriture à base de maïs et de soja, fournie par l'ONAB d'El Kseur, Bejaia. Les souris ont été réparties en lots de 6 souris/cage, étiquetées, l'âge, le sexe et le poids moyen (**Figure 12**).

Cette étude a été réalisée sur 8 lots pour l'étude de la génotoxicité de l'extrait éthanolique des graines de *P. lentiscus*, 2 lot pour l'étude du probable effet anti-génotoxique de ce dernier, 2 lot de contrôle positif chez qui la génotoxicité a été induite par le cyclophosphamide et 2 lot de contrôle négatifs traité uniquement par le véhicule utilisé (CMC).



Figure 12 : Répartition des animaux au niveau de l'animalerie (originale).

II.1.3-PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

Les produits utilisés pour l'extraction et le test de génotoxicité sont :

Éthanol 96% (Sigma Aldrich, Allemagne), Carboxy Méthyl cellulose (CMC) (Sigma Aldrich, États-Unis), Chlorure de Potassium (KCL) (PRS Panreac, Espagne), Méthanol (Biochem Chemopharma, Québec), Acide acétique (Sigma Aldrich, États-Unis), Colorant Giemsa

(Sigma Aldrich, Etats-Unis), Cyclophosphamide monohydrate (Sigma Aldrich, Chine), Colchicine (Biochem Chemopharma, Québec), Chloroforme (Biochem Chemopharma, Québec), Eurokit 100ml, mounting medium for clinical diagnosis (EMMONYA BIOTECH Ltd, Bulgarie), Xylène (Sigma Aldrich, Etats-Unis) et Huile à immersion (Carl Zeiss, Allemagne).

II.2-METHODES

Le test utilisé dans ce travail est celui des aberrations chromosomiques, observées au niveau des cellules de la moelle osseuse des souris en métaphase, décrit par **Preston et al. (1987)**, réalisé en cinq étapes pendant 10 jours.

II.2.1-TRAITEMENT DES ANIMAUX

Les lots d'animaux d'expérimentation ont été traités comme suit :

- Deux lots (6 mâles et 6 femelles) ont été gavés (**Figure 13**) avec du CMC 0.8% (véhicule), pendant 7 jours et ont été considérés comme des contrôles négatifs.
- Deux lots (mâles et femelles) ont été traités par administration orale du CMC (0.8%), pendant 7 jours et une injection intrapéritonéale (i.p.) du cyclophosphamide (50 mg/kg) (**Figure 13**) le 7^{ème} jour, 1 heure avant le dernier gavage.
- Huit lots (4 mâles et 4 femelles) ont été traités par gavage de l'extrait des graines de *P. lentiscus* à quatre différentes doses, à savoir 125, 250, 500 et 1000 mg/kg, répétées chaque 24 h, pendant 7 jours.
- Deux lots (1 mâle et 1 femelle) ont été traités par administration orale de l'extrait de *P. lentiscus* à la doses de 250 mg/kg, pendant 7 jours, associé à une induction de la génotoxicité, par l'injection intrapéritonéale du cyclophosphamide (50 mg/kg), 1 heure après le dernier gavage.



Figure 13 : Gavage et injections i.p des animaux (originale)

Dans le but d'augmenter le nombre de cellules en métaphases et fournir une analyse chromosomique plus facile, un inhibiteur mitotique a été injecté, la colchicine (4 mg/kg) 1 heure et demi, avant de les sacrifier.

II.2.2-SACRIFICE ET RECUPERATION DES CELLULES DE LA MOELLE OSSEUSE

Les souris sont anesthésiées dans du chloroforme, puis subissent une dislocation cervicale, puis la dissection de chaque animal permet de récupérer les deux fémurs. Ces derniers sont vidés et lavés dans des tubes contenant 8 ml de KCl préchauffés à 37°C, puis incubés pendant 30 minutes, à l'étuve toujours à la même température (**Figure 14**).

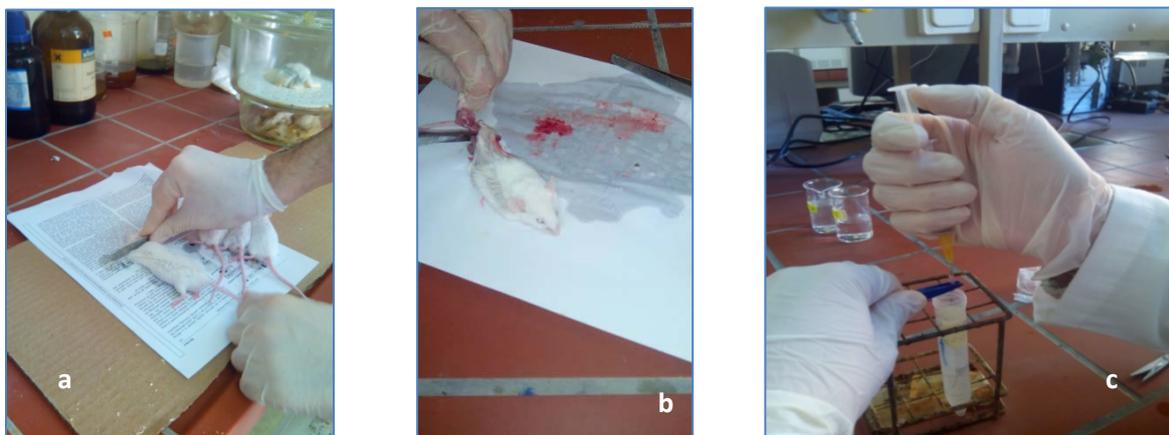


Figure 14 : a)Dislocation cervicale, b) dissection et récupération des fémurs, c) extraction de la moelle osseuse (original).

II.2.3-FIXATION DE CELLULES AVEC LA SOLUTION DE CORNOY

La solution fixatrice de Cornoy a été préparée avec l'acide acétique et du méthanol (1v :3v). Une série de centrifugation a été effectuée, les tubes contenant la moelle osseuse dans du KCl (0.56%) ont été centrifugés, pendant 10 min à 1500 g, les surnageant ont été éliminés et les culots resuspendus dans un volume minimale de KCl et 5 ml de fixateur ont été ensuite rajoutés goutte à goutte, en agitant manuellement. Une deuxième centrifugation a été directement effectuée pendant 10 min, les surnageant ont été jetés et les culots ont été resuspendus. 2 ml de fixateur ont été ajoutés, puis conserver à 4°C pour le lendemain.

Le 9^{ème} jour, d'autres centrifugations ont été effectuées avec renouvellement de la solution fixatrice, puis les culots ont été resuspendus avec la même solution. La 1^{ère} pendant 10 min à 1500 g, éliminer le surnageant, resuspendre et ajouter 5 ml de fixateur goutte à goutte, en agitant afin d'éviter la fixation des cellules en amas. Une 2^{ème} centrifugation s'effectue pendant 10 min, éliminer le surnageant, resuspendre et ajouter 2 ml de solution fixatrice.

Les suspensions obtenues ont été étalées sur des lames soigneusement nettoyées, laissé sécher une heure environ à l'air libre et à température ambiante.

II.2.4-COLORATION A LA GIEMSA ET FIXATION DES LAMELLES

Le colorant a été préparé juste avant son utilisation à une concentration de 10 %. Avec une pipette Pasteur, les lames ont été coloré, attendre 15 à 20 min, puis rincer avec de l'eau distillée et laisser sécher jusqu'au lendemain où les lamelles ont été fixées avec de la colle 'Eurokitté' et du xylène (**Figure 15**).



Figure 15 : Coloration des lames avec le GIEMSA (originale).

II.2.5-OBSERVATION ET ANALYSE DES LAMES

Chacune des lames a été analysée sous microscope optique, la sélection de 100 métaphases bien étalées ou spread a été faite au grossissement (GX40), puis les aberrations ont été détectées après le passage au grossissement (GX100), en utilisant l'huile à immersion. Une fiche comportant différents paramètres, à savoir le calcul du nombre de cellules en division, le nombre de cellules en interphase (minimum 1000 cellules/ souris), et celui des aberrations présentes dans chaque métaphase spread des 100 recensées, notamment les gaps, rings, associations centromériques, délétions, fragments, pulvérisations et polyploïdies, a été remplie.

Les résultats ainsi obtenu sont utilisés pour le calcul des indices mitotiques de chaque souris selon la formule suivante :

$$IM(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules en division}}{\text{Nombre total de cellules dénombrées}} * 100$$

Un calcul de pourcentage de cellules aberrantes a été effectué aussi :

$$PA(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules aberrantes}}{\text{Nombre total de cellules dénombrées}} * 100$$

II.2.6-ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats de l'ensemble des tests réalisés sont exprimés en moyenne \pm SEM (n= 5). Les analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.0. Le test Anova univarié (one-way Anova), suivi du test de Dunnett, afin de comparer les valeurs des groupes traités aux valeurs du groupe contrôle, et le test de Tukey, pour comparer les valeurs entre elles, ont été utilisées. Les différences ont été considérées comme significations à $P < 0,05$, avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III-1-RESULTATS

III.1. ACTIVITE GENOTOXIQUE DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Les résultats des indices mitotiques calculés, ainsi que les pourcentages d'aberrations chromosomiques pour les lots de souris traitées par le CMC (0.8%) et le CP (50mg/kg) sont représentés dans les histogrammes suivants :



Figure 16 : Représentation graphique des indices mitotiques des groupes témoins négatif (CMC 0.8%) et positif (CP 50mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=5) *P<0.001 comparé au contrôle négatif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunnett a été utilisé pour l'analyse statistique. CMC :Carboxy Méthyl Cellulose, M :Mâles, F :Femelle.

Les souris Mâles traitées avec le cyclophosphamide présentent un indice mitotique significativement réduit ($6,02 \pm 0,9 \%$, $p < 0,001$), par rapport à celui exhibé par les souris contrôles négatifs, qui ont reçu du CMC ($19,56 \pm 1,58 \%$).

La même observation est constatée chez les souris femelles où les souris traitées avec le cyclophosphamide ont présenté un indice mitotique de $6,42 \pm 0,72\%$ contre $19,14 \pm 1,77\%$ pour les souris contrôles.

Cette diminution de l'indice mitotique est associée à une augmentation significative (***) ($p < 0,0001$) des cellules contenant des aberrations chromosomiques (avec et sans Gaps).

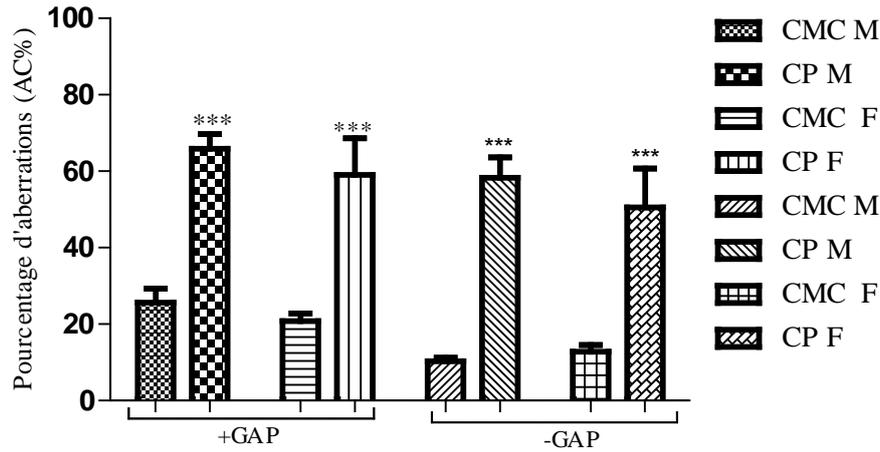


Figure 17 : Représentation graphique du pourcentage d’AC des groupes témoins négatif (CMC 0.8%) et positif (CP 50 mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne ±S.E.M. (n=5) *P<0.001 comparé au contrôle négatif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l’analyse statistique.

Les différents types d’aberrations chromosomiques détectées dans les cellules de la moelle osseuse des souris et leurs abondances sont rapportés dans le tableau IV et illustrées par les photographies de la (Figure 18).

Tableau IV: Fréquences des aberrations chromosomiques des cellules de la moelle osseuse des souris témoins négatif (CMC) et positif (CP).

Doses (mg/kg)	Met.spread Number	Différentes aberrations chromosomiques								%des cellules aberrantes	
		Gap	anneau Ring	Fragment	Del. chrom	Ass .cent	Pulvérisation	Polyploïdie	Σ +Gap	Σ -Gap	
C-	♀	50	9	1	3	0	1	0	0	22	12
		50	9	1	3	1	0	0	0	22	10
		80	13	7	81	2	15	2	68	87	83
		100	7	3	33	8	0	0	5	19	16
	♂	50	5	1	1	1	2	0	1	18	12
		100	14	5	34	13	4	0	0	17	11
		50	15	1	2	1	1	0	1	26	11
		100	11	4	11	9	2	0	0	28	19
C+	♀	100	15	23	182	82	5	10	0	75	71
		100	22	0	67	43	9	1	0	49	48
		100	56	4	151	97	8	7	0	76	70
		100	13	7	81	15	2	68	0	87	83
	♂	80	13	7	81	2	15	2	0	87	83
		100	41	36	12	60	12	8	2	75	69
		84	15	8	27	0	1	6	2	70	52
		100	8	10	96	33	7	5	0	71	70
		100	6	1	6	3	8	1	0	77	59

On remarque clairement que le cyclophosphamide a induit différents types d'aberrations, notamment les pulvérisations, les fragments, les gaps, les polyploïdies, les associations chromosomiques et anneau.

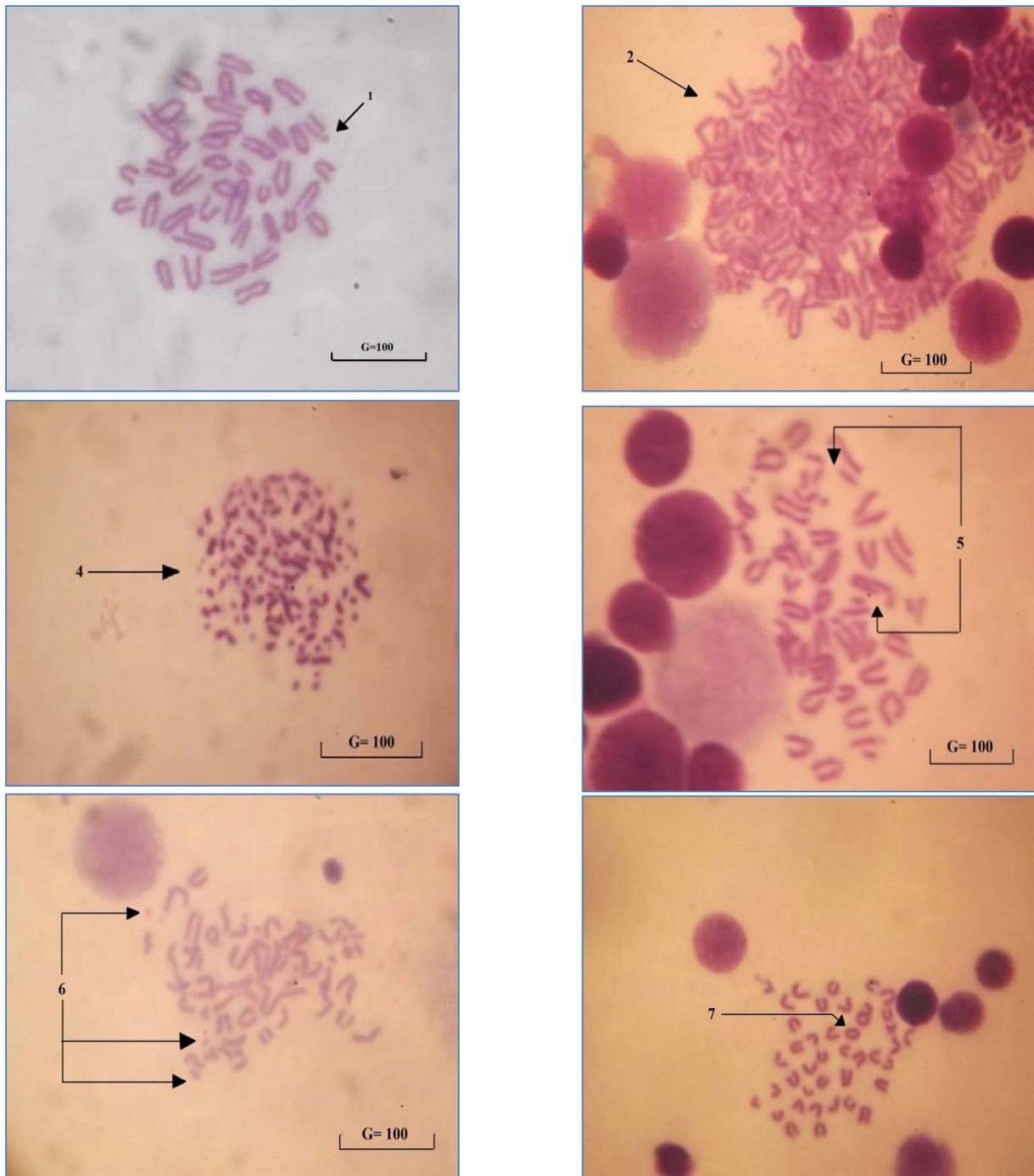


Figure 18 : Différents types d'aberrations chromosomiques induites par le CP, détectées lors de l'analyse des cellules de la moelle osseuse des souris, sous microscope optique GX100, 1- gap(vide), 2-polyploïdie, 3-association centromériques, 4-pulvérisation, 5 et 6- délétions et fragments, 7- anneau (ring) (originale).

III.2-EVALUATION DE L'ACTIVITE GENOTIXIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES GRAINES DE *PISTACIA LENTISCUS*

Les résultats du calcul de l'indice mitotique des cellules de la moelle osseuse de fémurs de souris traitées avec l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* à différentes concentrations notamment 125, 250, 500 et 1000 mg/kg sont illustrées dans la figure suivante.

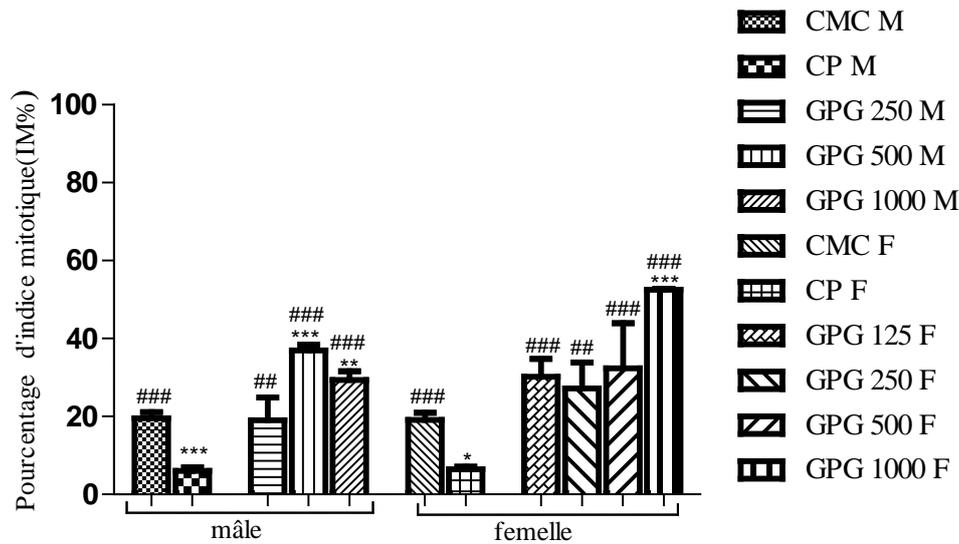


Figure 19 : Effet cytotoxique du CP et des différentes concentrations de l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* (125, 250, 500 et 1000 mg/kg) sur les cellules de la moelle osseuse des souris mâles et femelles. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=5) *P<0.001 comparé au contrôle négatif et #p<0,001 compare au contrôle positif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l'analyse statistique. GPG : Génotoxicité *Pistacia* Graine

L'histogramme ci-dessus révèle des indices mitotiques comparables au contrôle négatif chez les souris mâles et femelles traitées avec l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* aux concentrations de 125 et 250 mg/kg. Par ailleurs, les indices mitotiques sont significativement élevés (**P<0.001), avec les traitements aux concentrations de 500 et 1000mg/kg.

D'une autre part, tous les indices mitotiques enregistrés chez les souris mâles et femelles traitées avec les quatre concentrations utilisées de l'extrait éthanolique des graines de la plante étudiée sont significativement élevés (###P<0.001), en comparaison à celui exhibé par le cyclophosphamide.

Les résultats de calcul des pourcentages de cellules aberrantes de la moelle osseuse de fémurs de souris traitées avec l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* à différentes concentrations, notamment 125, 250, 500 et 1000 mg/kg sont illustrés dans la figure suivante.

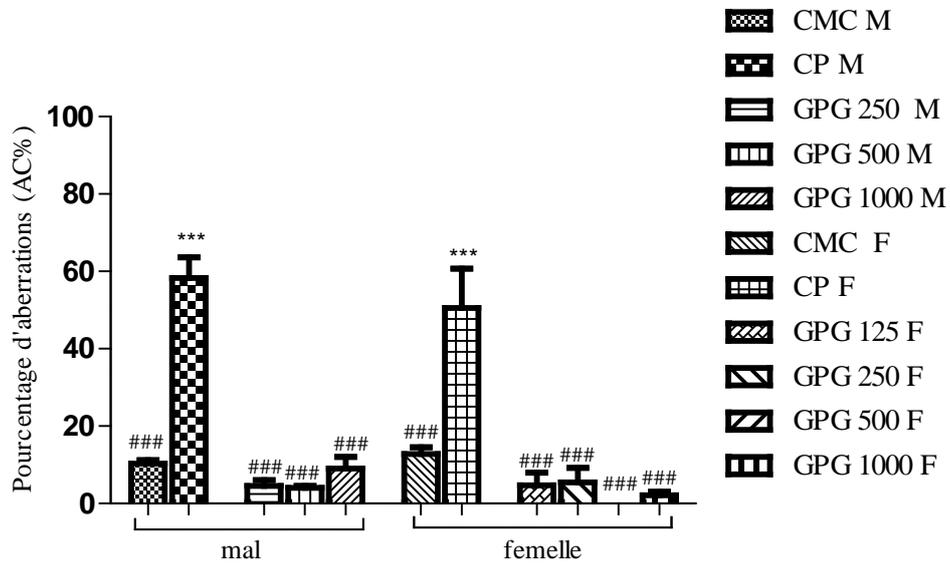


Figure 20: Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique des graines *P.lentiscus* à différentes concentrations (125, 250, 500 et 1000 mg/kg) sur le pourcentage d'AC (sans gap) des cellules de la moelle osseuse des souris mâles et femelles. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=4), ***P<0.001 comparé au contrôle négatif et ####P<0.001 comparé au CP (50g/kg).One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l'analyse statistique.

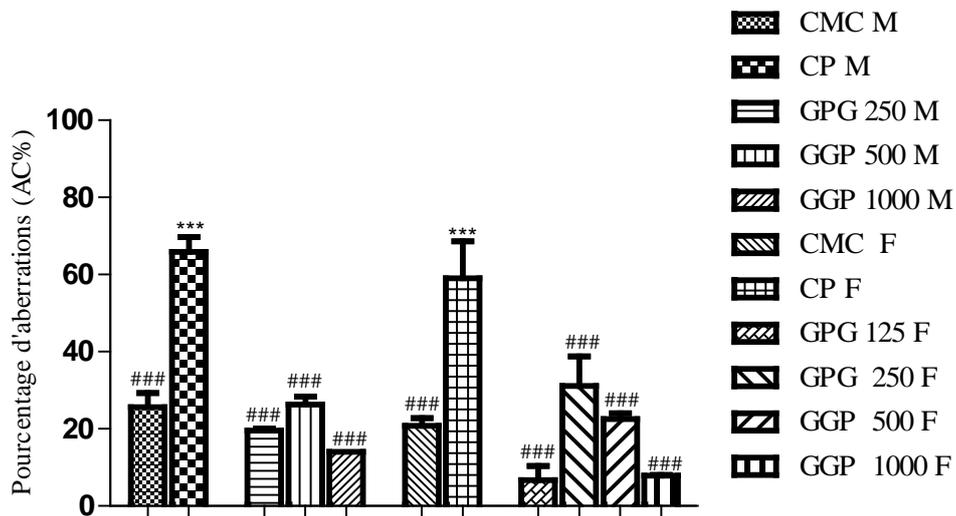


Figure 21: Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique des graines de *P.lentiscus*. à différentes concentrations (125, 250, 500 et 1000 mg/kg) sur le pourcentage d'AC (avec gap) des cellules de la moelle osseuse des souris mâles et femelles. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=4), ***P<0.001 comparé au contrôle négatif et ####P<0.001 comparé au CP (50g/kg).One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l'analyse statistique.

Les résultats exhibés dans les deux histogrammes ci-dessus ont montré que les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des graines de *P.lentiscus* ont présenté des pourcentages d'aberrations semblables à ceux exhibés par les souris contrôles que ça soit chez les mâles ou chez les femelles. Ces pourcentages sont nettement et significativement inférieures (###P<0.001), par rapport à ceux révélés par les souris traitées avec le cyclophosphamide, mâles et femelles.

Les mêmes résultats ont été observés, concernant les pourcentages d'aberrations incluant les gaps.

Le tableau ci-dessous illustre les différents types d'AC avec et sans gaps, ainsi que leurs fréquences chez les souris, traitées avec les différentes concentrations d'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* (125,250 ,500 et 1000 mg/kg).

Tableau V : Types et fréquences des aberrations chromosomiques de moelles osseuses de souris traitées par l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus*, aux concentrations 125, 250, 500 et 1000 mg/kg.

Doses (mg/kg)	sexe	Metaphase. spread Number	Différentes aberrations chromosomiques							%des cellules aberrantes	
			Gap	anneau Ring	Fragments	Del.chrom	Ass .cent	Pulvérisation	Polyploïdie	∑ +Gap	∑ -Gap
125	♀	50	3	0	0	0	0	0	0	3	0
		50	1	0	0	0	0	0	0	2	0
		50	25	2	10	1	0	0	0	14	14
250	♀	100	24	2	5	17	0	0	0	30	13
		87	29	0	1	2	0	0	0	18,3	2,2
		100	103	0	1	0	0	0	0	45	1
	♂	100	26	1	1	0	0	0	1	19	3
		100	26	0	7	2	2	0	1	20	6
500	♀	100	41	0	0	0	0	0	0	21	0
		100	48	0	0	0	0	0	0	24	0
	♂	100	45	2	1	2	2	0	0	26	4
		100	56	0	3	4	0	0	0	30	3
		100	42	0	1	1	1	0	1	23	5
			100	42	0	1	1	1	0	1	23
1000	♀	100	6	3	0	0	0	0	0	8	3
		77	11	1	0	0	0	0	0	7,79	1,2
	♂	100	4	4	3	4	4	0	0	14	12
		50	4	0	3	1	3	0	0	14	6

III.3-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI GENOTOXIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES GRAINES DE *PISTACIA LENTISCUS*

Dans le but d'évaluer l'effet anti-génotoxique contre les dommages induits par le CP, les souris ont été administrées par voie orale par l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus*, à 250mg/kg et traitées par voie intrapéritonéales avec le CP (50g/kg). Les résultats sont représentés dans l'histogramme suivant.

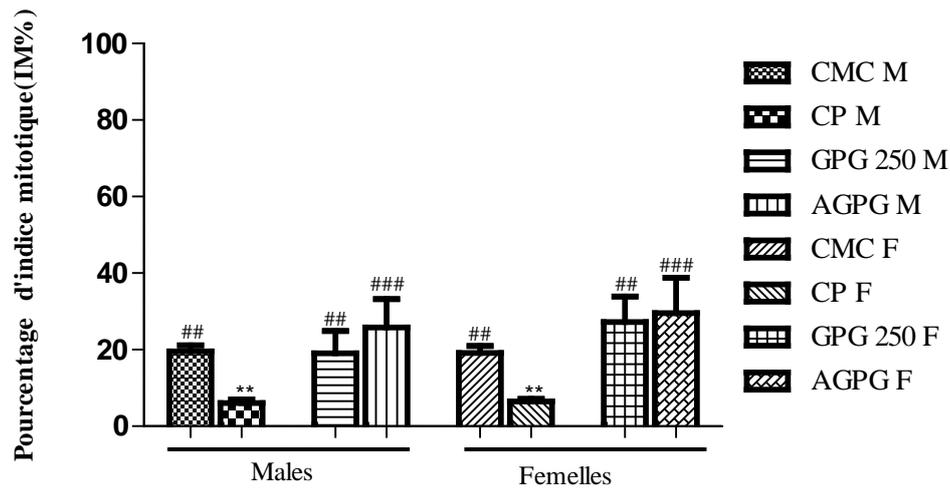


Figure 22 : Représentation graphique de l'IM des cellules de la moelle osseuse des souris suite à la Co-administration du CP et l'extrait des graines de *P.lentiscus*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=4), (**P<0.001) comparé au contrôle négatif et (###P<0.001) comparé au CP (50g/kg). One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l'analyse statistique. AGPG : Antigénotoxicité Graines *Pistacia lentiscus*.

L'histogramme ci-dessus montre une augmentation significative (###P<0.001) de l'indice mitotique chez les lots traités par l'extrait de plante (250mg/kg) et le cyclophosphamide (50 mg/kg), qui atteint les valeurs des contrôles négatifs.

Les taux de cellules aberrantes de la moelle osseuse (avec ou sans gap) de souris traitées avec l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* à 250 mg/kg, en association avec le cyclophosphamide à 50mg/kg sont illustrés dans les figure suivantes.

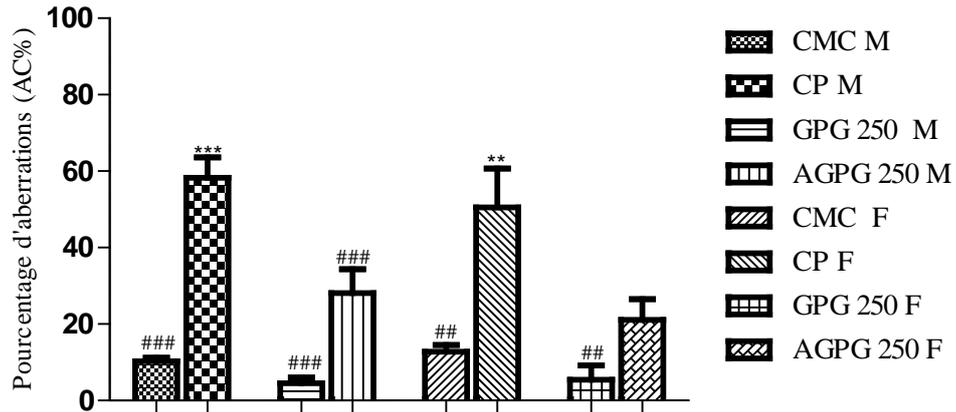


Figure 23 : Représentation de l’activité antigénotoxique (sans gap) des extraits de graines de *P.lentiscus*, à 250mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=4) (**P<0.001) comparé au contrôle négatif et (###P<0.001) comparé au CP (50g/kg). One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l’analyse statistique.

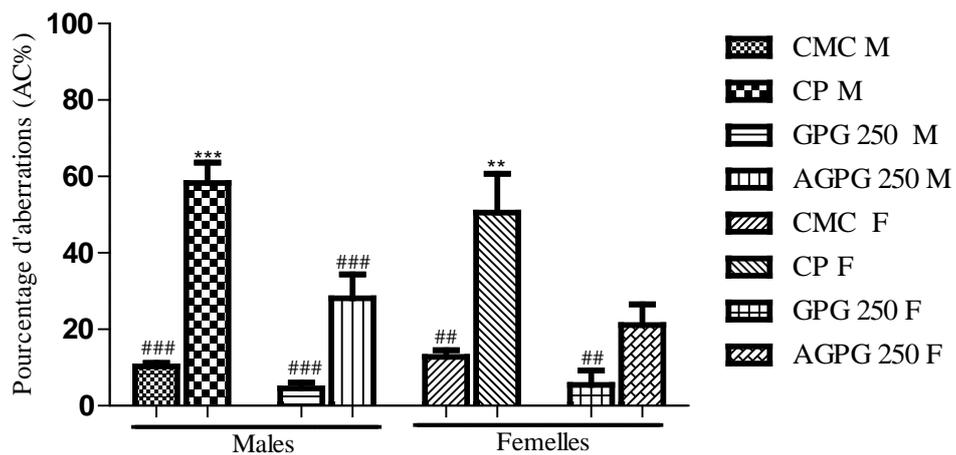


Figure 24 : Représentation de l’activité antigénotoxique (avec gap) des extraits de graines de *P.lentiscus*, à 250mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. (n=4) (**P<0.001) comparé au contrôle négatif et (###P<0.001) comparé au CP (50g/kg). One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Dunett a été utilisé pour l’analyse statistique.

On remarque clairement d’après les figures 08 et 09 que les taux des aberrations chromosomiques ont été significativement réduits, en traitant les souris avec l’extrait éthanolique des graines de *P.lentiscus* à 250 mg/kg , en comparaison au taux démontré par le traitement des souris avec le cyclophosphamide seul.

L’augmentation de l’indice mitotique est associé à une diminution significative (###p<0.001) des cellules contenant des aberrations chromosomiques (avec et sans Gaps)

évalué dans les deux histogrammes ci-dessus, ce qui justifie l'activité antigénotoxique de l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis le CP.

Le tableau suivant montre les différentes fréquences d'AC chez les souris traitées avec l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* à 250 mg/kg, en association avec le cyclophosphamide.

Tableau VI : Types et fréquences des aberrations chromosomiques de moelles osseuses de souris traitées par l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* (250 mg/kg), en association avec le cyclophosphamide (50 mg/kg).

Doses (mg/kg)	sexe	Met.spread Number	Différentes aberrations chromosomiques							%des cellules aberrantes	
			Gap	Ring	Fragment	Del.chr	Ass .cent	Pulvérisation	Polyploïdie	Σ +Gap	Σ -Gap
C-	♀	50	9	1	3	0	1	0	0	22	12
		50	9	1	3	1	0	0	0	22	10
		80	13	7	81	2	15	2	68	87	83
	♂	100	7	3	33	8	0	0	5	19	16
		50	5	1	1	1	2	0	1	18	12
		100	14	5	34	13	4	0	0	17	11
		50	15	1	2	1	1	0	1	26	11
		100	11	4	11	9	2	0	0	28	19
C+	♀	100	15	23	182	82	5	10	0	75	71
		100	22	0	67	43	9	1	0	49	48
		100	56	4	151	97	8	7	0	76	70
		100	13	7	81	15	2	68	0	87	83
		80	13	7	81	2	15	2	0	87	83
	♂	100	41	36	12	60	12	8	2	75	69
		84	15	8	27	0	1	6	2	70	52
		100	8	10	96	33	7	5	0	71	70
		100	6	1	6	3	8	1	0	77	59
AGPG	♀	70	7	1	>60	8	0	0	0	20	15,71
		79	11	1	64	29	0	8	0	37,9	26,58
	♂	75	6	0	57	25	0	1	2	40	33,33
		65	10	0	139	21	0	10	10	44,6	35,38
		70	15	0	52	12	0	1	1	28,5	15,71

Il ressort clairement de ce tableau que les pourcentages de chaque type d'aberration, déjà énumérés, en traitant les souris avec le cyclophosphamide seul, est réduit significativement par le traitement avec l'extrait de la plante étudiée.

IV-DISCUSSION

Les cellules cancéreuses sont souvent liées aux anomalies chromosomiques qui résultent probablement des mutations des gènes impliqués dans le maintien de la stabilité chromosomique. La mutation initiale de gènes crée une impulsion d'une nouvelle instabilité génomique, y compris les aberrations chromosomiques qui peuvent culminer dans la progression tumorale (**Gamal-Eldeen et al., 2013**).

Ces mutations sont à l'origine de différents facteurs endogènes ou exogènes tel que l'exposition aux agents génotoxique. Le cyclophosphamide est un agent alkylant antinéoplasique bifonctionnel de la classe des oxazaphosphorine, appartenant à la famille de moutardes azotées. Il est utilisé en chimiothérapie afin de traiter différents type de cancer. suite à son métabolisme par les cytochromes P450 du foie, le CP génère des métabolites toxiques dont la MPA et l'acroléine (**Anderson et al., 1995**). L'activité génotoxique du CP a été mise en évidence par l'induction d'un pourcentage élevé d'AC, au niveau des cellules de la moelle osseuse des souris, rapportée par plusieurs autres auteurs (**El Souda et al., 2014**).

Il a été rapporté que les métabolites actives de CP (MPA et l'acroléine), qui produisent potentiellement des liaisons avec les acides nucléiques de l'ADN (inter ou intra-brins) ou avec des protéines conduisant à des cassures de brins, par alkylation de l'ADN à la position N7 de la guanine (**Liu et al., 2014; Zhang et al., 2009**). différentes études ont démontré que le CP induit des aberrations et l'apoptose par un mécanisme de génération des radicaux libres non seulement au niveau des cellules cancéreuses mais aussi au niveau des cellules non tumorales, conduisant éventuellement à des mutations géniques et au cancer secondaire (**Kern et Kehrer, 2002; Yadav et al., 2014; Zhang et al., 2009**).

Le traitement des cellules de la moelle osseuse des fémurs des souris a engendré des dommages au niveau de l'ADN comparés au control négatif cela a été rapporté par RAJA(**Raja et al., 2010**).

Ces dommages peuvent être due à la génération de stress oxydant qu'est à l'origine d'une diminution des activités antioxydantes principales et l'augmentation des radicaux libres et de la peroxydation lipidique (**Lata et al., 2014**).

Il a été rapporté que le CP induit un cancer secondaire suite à sa génotoxicité(**Çavuşoğlu et al., 2009**).

La présente étude a pour objectif l'évaluation de l'activité cytotoxicité et l'antigénotoxicité des extraits éthanolique de *Pistacia lentiscus* à différentes concentrations (125,250,500 et 1000 mg/kg), suivant le test d'aberrations chromosomiques décrits par Preston (**Preston et al., 1987**)

Ce test a été choisi puisqu'il prend en considération tous les paramètres de métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN (**Krishna & Hayashi, 2000**).

La différence entre le pourcentage d'AC au niveau des cellules de la moelle osseuse des souris mâles et femelles chez les témoins traités avec le CP et celui du contrôle négatif est très hautement significative avec et sans gaps, aucune différence significative n'a été observée entre les mâles et les femelles.

Les indices mitotiques des contrôles négatifs CMC 0.8% ($19.56 \pm 1.58\%$) étant plus élevée que ceux du groupe traité par le CP à 50 mg/kg ($6.02 \pm 0.9\%$) ont approuvé la cytotoxicité du CP.

L'indice mitotique qu'est un ratio entre le nombre de cellules en mitose et le nombre total de cellules dans une population, donnant une mesure de la vitesse de prolifération de cette population de cellules (**DE, 2014**), c'est un paramètre d'évaluation de la cytotoxicité d'agents mutagènes. Sa réduction par rapport au control négatif est un indicateur de cytotoxicité (**Kumari et al., 2009**).

L'étude présente a démontré la génotoxicité et la cytotoxicité des métabolites du cyclophosphamide induites sur les cellules de la moelle osseuse prélevés à partir des fémurs de souris.

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier leurs principes actifs. Ces études consacrées essentiellement au mastic ont montré la présence de flavonoïdes, des huiles essentielles, ainsi que des triterpenoides (**Marner et al., 1991**). Cependant, on ne trouve que peu d'études qui se sont intéressées aux composés chimiques des fruits. Selon Luigia et ses collaborateurs (2007), les fruits de *Pistacia lentiscus* contiennent 5,4mg/ml d'anthocyanines, essentiellement: cyanidine 3-O-glucoside (70%), delphinidine 3-O-glucoside (20%) et cyanidine 3-O-arabinoside (10%). Deux polyphénols, l'acide gallique et le pentagalloylglucose (**Abdelwahed et al., 2007**) et l'acide digallique (**Bhouri et al., 2010**) ont été isolés de l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits de *Pistacia lentiscus*.

D'après (**Déciga-Campos et al., 2007**), 8000 polyphénols sont connus, l'étude des propriétés mutagéniques n'a été faite que sur 200 molécules environ par des tests bactériens. La quercétine un flavonoïde qui a montré l'effet mutagène le plus fort, soit en se liant directement à l'ADN (**Alvi et al., 1986**) ou par la catalyse de la réaction de synthèse des N-nitroso molécules à partir des nitrates et des nitrites intracellulaires, provoquent des effets carcinogènes (**Ferguson, 2001**) comme elle peut agir comme un poison des topoisomérase et provoque ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (**Uddin et Choudhry, 1995**).

Les polyphénols qui n'ont pas d'effet mutagène lors des tests bactériens, peuvent être clastogénique vis-à-vis des cellules des mammifères. L'étude des effets mutagènes sur les organismes supérieurs est très limitée. Il a été démontré que les différentes classes des polyphénols y compris les flavonoïdes, sont capables de catalyser le clivage de l'ADN par oxydation en particulier en présence d'ion de métaux de transition tel que le cuivre et le fer (**Bhouri et al., 2010**) c'est le cas de l'acide tannique en présence de Cu, provoque une dégradation de l'ADN par la génération des ERO (hydroxyles). L'activité de l'acide tannique est due à ses entités digalloyl et ses groupements hydroxyles libres qui pourraient fournir d'importants mécanismes de mutagénicité.

Les flavonoïdes dont la structure est similaire à celles de la quercétine, initient la peroxydation lipidique des lipides de la membrane nucléaire et ils provoquent des cassures au niveau de l'ADN. Ce qui n'a pas été observé chez les souris ayant reçu l'extrait éthanolique de graines de *Pistacia lentiscus* à des concentrations croissantes. Ce qui n'a pas été observé lors du traitement des souris par l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus*, cela pourrait être expliqué par la faible concentration de ces composés au niveau du fruit de la plante objet.

D'autre part, un grand nombre de polyphénols simples sont connus pour leur activité antimutagénique (**Ohta, 1993**). Différentes études ont montré que l'acide gallique et PGA présentent un potentiel anti radicalaire, ces deux composés exercent une action inhibitrice importante contre la peroxydation lipidique et ces résultats sont similaires à ceux rapportés par (**Hanasaki et al., 1993**).

Certains polyphénols peuvent influencer sur l'activité des enzymes de réparation de l'ADN par modulation de l'expression des gènes. Néanmoins, très peu d'essais in vivo ont été menés pour permettre d'affirmer si les polyphénols peuvent prévenir la formation d'adduits de l'ADN in vivo (**Breinholt et al., 1999**). Il a été rapporté que la formation d'adduits au niveau hépatique n'a pas été affectée par l'administration de flavonoïdes, la formation du même

adduit au niveau du colon a été significativement inhibée par la quercitine. L'étude présente a démontré l'antigénotoxicité et la non cytotoxicité des métabolites de l'extrait éthanolique sur les cellules de la moelle osseuse prélevés à partir des fémurs de souris. La diminution des taux d'AC ainsi que l'augmentation des indices mitotique pourrait être due à la richesse des graines de *Pistacia lentiscus* en ce type de polyphénols.(**Ferguson, 2001**)

Une corrélation entre la consommation d'antioxydants phénoliques et la réduction des risques de maladies cardiovasculaires, tout comme la réduction d'un certain nombre de cancers a été rapporté par (**Hertog et al., 1996**). En effet, L'activité anti oxydante la plus probablement associée aux polyphénols est celle du scavenging des radicaux libres(**Ferguson, 2001**)

Les polyphénols peuvent inhiber la fonction du CYP450 et d'autres enzymes ayant des activités antioxydante tels que l'hypo-oxygénase et cyclo-oxygénase, ils ont également la capacité de se lier de façon bénéfique dans certains cas à des minéraux tel que le fer, précurseurs de radicaux hydroxyles(**Lopes et al., 1999; Thompson et al., 1976**).L'acide tannique inhibe la formation de radicaux hydroxyles en se liant aux ions ferreux

Ils peuvent également lier des ions métalliques capables de catalyser la peroxydation lipidique, ils interfèrent aussi avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules

Les composés isolés (agricole et glycoside) contiennent des anthocyanines ou des anthocyanidines sont hautement potentielle *in vitro* (**Pool-Zobel et al., 1999**).L'interaction des flavonoïdes tel que la quercitine et la catéchine avec les espèces antioxydantes intracellulaires tel que, le glutathion peroxydase et inhiber leur activité antioxydante(**Nagata et al., 1999**).Il a été suggéré que certains polyphénols initient la détoxification enzymatique ;un mécanisme potentiel qui initie l'antimutagènes/anti carcinogènes *in vivo*.

La majorité des polyphénols induisent l'apoptose, les flavonoïdes induisent une inhibition de la croissance des cellules après leur stimulation par la libération du cytochrome c dans le cytosol. L'induction de l'apoptose dépend de la structure des polyphénols et du type cellulaire. Sakagoshi et ses collaborateurs ont suggéré que le signal de mort induit par l'acide gallique divers selon le type des cellules, bien que la production des espèces réactives de l'O₂ tel que H₂O₂ et l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium sont des signaux en commun(**Wang et al., 1999**).

L'acide digallique se présente à de forte concentrations au niveau des graines de *Pistacia lentiscus* (Bhouri et al., 2010). il semble être le scavenger le plus puissant du radical ABTS+, par la capacité de libérer des électrons ou des atomes hydrogènes pour inactiver le cation radicalaire (Fahmy et al., 2015); une propriété des espèces antioxydantes ;cela peut être explique par le fait que la molécule DGA est un flavonoïde riche en groupement hydroxyle qui stabilisent les espèces réactives de l'oxygènes par interaction avec les composes réactifs du radical, ce denier deviens inactif en raison de la haute réactivité du groupement hydroxyle des flavonoïdes (Nigi 2001).L'activité antioxydantes a susciter plus d'intérêt à l'égard de leurs effets protecteur contre les radicaux libres de nombreuses maladies y compris le cancer(Tijing et al., 2014). Selon Bhouri et al le DGA est capable d'interagir et neutraliser les électrophiles et peut inhiber l'activation de microsomes (métabolite électrophiles), ou protéger directement les brins d'ADN contre les métabolite électrophiles du mutagène (*Pistacia* est antigénotoxique diminution de taux d'aberrations qui pourrait être due à l'activité de DGA), il peu inhiber plusieurs intermédiaires métaboliques et les ERO formée lors du processus de l'activation des enzymes microsomale capable d'endommager les brins d'ADN(Fahmy et al., 2015). Le DGA a présenté une protection importante aux concentrations de 200 et 400 µg/ml contre la peroxydation lipidique induite par le H2O2 au niveau des cellules lymphoblastique cancéreuses humaine. (Bhouri et Portalatine, 2007)ces études appuient les résultats obtenu lors de l'évaluation du taux d'AC qui s'est avéré être inférieur au taux lors de l'administration du CP.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'utilisation des plantes médicinales a connu un essor important ces dernières années grâce aux propriétés thérapeutiques, qu'elles procurent.

Notre étude avait pour but d'évaluer l'activité génotoxique et antigénotoxique de l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* sur le cancer secondaire, induit par le cyclophosphamide. Le test des aberrations chromosomique a été utilisé et l'effet cytotoxique a été évalué, en mesurant les indices mitotiques (IM), ainsi l'effet antigénotoxique a été recensé, en quantifiant le pourcentage des aberrations chromosomiques au niveau des cellules de la moelle osseuse des souris males et femelle, après traitement avec les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus*.

Les cellules du groupe des souris traité avec le cyclophosphamide, utilisé comme témoins positif ont révélé une génotoxicité significative, par réduction de l'indice mitotique et augmentation du taux des aberrations chromosomiques, par rapport aux témoins négatifs (CMC).

Le traitement des cellules avec les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des graines de *P.lentiscus* (125, 250, 500 et 1000 mg/kg) a démontré une augmentation significative de l'indice mitotique, par rapport à l'agent mutagène (CP) et une diminution significative du pourcentage des aberrations chromosomiques. Ce qui nous laisse conclure que les concentrations testées de l'extrait des graines ne présentent pas de cytotoxicité, ni génotoxicité.

Le traitement des souris avec l'extrait de plante (250mg/kg), combiné au CP ont démontré une réduction du pourcentage d'AC, ainsi qu'une élévation de l'indice mitotique. suggérant ainsi un effet protecteur, vis-à-vis, du CP.

L'activité antigénotoxique des graines de *Pistacia lentiscus* démontrée dans notre étude est probablement liée à la richesse de cette plante en composés phénoliques, qui ont une forte activité scavenger de radicaux libres.

En perspectives, il est intéressant de compléter cette étude génotoxique et antigénotoxique avec d'autres tests, notamment la méthode des micronoyaux et d'évaluer les activités antioxydants des homogénats de foie afin de relier l'effet observé au pouvoir antioxydant de la plante et chercher d'autres voies de mécanismes et interactions entre les composés phytochimiques de plantes et de macromolécules biologiques, dans le but de cibler les molécules bioactives et leur mécanismes d'action, pour une éventuelle activité protectrice ou une bithérapie, en association avec les molécules utilisées en chimiothérapie.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelwahed, A., I. Bouhleb, et al. (2007). "Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling." Chemico-biological interactions **165**(1): 1-13.
- Adami, H.-O. (2008). Textbook of cancer epidemiology, Oxford University Press, USA.
- Ahlem, M. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive Présidant: Pr. BOURICHE Rapporteur: Pr. BELATTAR Noureddine. Pr. Examineur: Pr. BOUZIDI Pr. AMIRA Sétif, Université Ferhat Abbas de Sétif 1.
- Aarcon, R., J. Meienhofer, et al. (1972). "Isophosphamide as a new acrolein-producing antineoplastic isomer of cyclophosphamide." Cancer research **32**(11): 2519-2523.
- AL-Saghir, M. G., & Porter, D. M. (2012). Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L.(Anacardiaceae). American Journal of Plant Sciences, 3(1), 12.
- Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z and Mahajna J (2000). Ethnobotanical survey in the palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. J Ethnopharmacol, 73, 221-232
- Alvi, N., R. Rizvi, et al. (1986). "Interaction of quercetin with DNA." Bioscience Reports **6**(10): 861-868.
- Anderson, D., J. B. Bishop, et al. (1995). "Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **330**(1): 115-181.
- Azaizeh, H., F. Halahleh, et al. (2013). "Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae." Veterinary Parasitology **191**(1–2): 44-50.
- Bampouli, A., K. Kyriakopoulou, et al. (2015). "Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS." Journal of Food Engineering **167, Part A**: 25-31.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benedict, W. F., M. S. Baker, et al. (1977). "Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella/microsome test." Cancer research **37**(7 Part 1): 2209-2213.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. H., Shams-Ardekani, M. R., & Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. The Scientific World Journal, 2013.
- Bhour, W., S. Derbel, et al. (2010). "Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits." Toxicology in Vitro **24**(2): 509-515.
- Botta, A. (2006). "Interrelations entre génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse." Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement **67**(2): 295-297.
- Bouraoui, S., A. Brahem, et al. (2011). "Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs." Environmental Toxicology and Pharmacology **31**(1): 250-257.
- Boyland, E. (1956). *la carcinogenese et le cancer chez l'homme*, editions scientifiques medicales elsevier 23 rue linois, 75724 paris cedex 15, france.
- Brade, W. P., K. Herdrich, et al. (1985). "Ifosfamide-pharmacology, safety and therapeutic potential." Cancer Treatment Reviews **12**(1): 1-47.
- Çavuşoğlu, K., K. Yapar, et al. (2009). "Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice." Journal of medicinal food **12**(6): 1286-1292.
- Chauvergne, J. and B. Hoerni (2001). Chimiothérapie anticancéreuse, Elsevier Masson.
- Cheurfa, M., & Allem, R. (2015). Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo. Revista Brasileira de Farmacognosia, **25**(2), 142-144.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Colvin, M. E. and J. N. Quong (2002). "DNA-alkylating events associated with nitrogen mustard based anticancer drugs and the metabolic byproduct Acrolein." Advances in DNA Sequence-Specific Agents **4**: 29-46.
- Colvin, O. (1999). "An overview of cyclophosphamide development and clinical applications." Current pharmaceutical design **5**: 555-560.
- Cox, P. J. (1979). "Cyclophosphamide cystitis—identification of acrolein as the causative agent." Biochemical pharmacology **28**(13): 2045-2049.
- Crook, T. R., R. L. Souhami, et al. (1986). "Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells." Cancer research **46**(10): 5029-5034.
- Czczot, H., B. Tudek, et al. (1990). "Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs." Mutation Research/Genetic Toxicology **240**(3): 209-216.
- DE, E. C. A. S. C. (2014). "LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES."
- DE POLYPHENOLS, I. (2010). François Nsemi MUANDA, Université Montpellier 1 France.
- Duval, A. and R. Hamelin (2003). "Réparation des erreurs de réplication, microsatellites et cancer." M/S: médecine sciences **19**(1): 55-62.
- Eder, E., C. Hoffman, et al. (1990). "Molecular mechanisms of DNA damage initiated by alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds as criteria for genotoxicity and mutagenicity." Environmental health perspectives **88**: 99.
- El Souda, S. S. E. D., R. S. Mohammed, et al. (2014). "Antimutagenicity and phytoconstituents of Egyptian Plantago albicans L." Asian Pacific Journal of Tropical Disease **4**: S946-S951.
- Fahmy, M. A., N. H. A. Hassan, et al. (2015). "A mixture of honey bee products ameliorates the genotoxic side effects of cyclophosphamide." Asian Pacific Journal of Tropical Disease **5**(8): 638-644.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fardel, O., L. Vernhet, et al. (2010). Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets. Journée de restitution RECORD.
- Ferguson, L. R. (2001). "Role of plant polyphenols in genomic stability." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **475**(1): 89-111.
- Foiles, P. G., S. A. Akerkar, et al. (1990). "Formation of cyclic deoxyguanosine adducts in Chinese hamster ovary cells by acrolein and crotonaldehyde." Carcinogenesis **11**(11): 2059-2061.
- Gamal-Eldeen, A. M., M. A. Abo-Zeid, et al. (2013). "Anti-genotoxic effect of the *Sargassum dentifolium* extracts: Prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation." Experimental and Toxicologic Pathology **65**(1): 27-34.
- Graham, M., R. Riley, et al. (1991). "Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy." Pharmacology & therapeutics **51**(2): 275-289.
- Grant, W. F. (1999). "Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **426**(2): 107-112.
- Grochow, L. B. and M. Colvin (1979). "Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide." Clinical pharmacokinetics **4**(5): 380-394.
- Guerrero, I. and A. Pellicer (1987). "Mutational activation of oncogenes in animal model systems of carcinogenesis (MTR 07217)." Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology **185**(3): 293-308.
- Hammiche V. (2015) Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle, Treatment of cough based on traditional kabylian pharmacopoeia *Phytothérapie* **13**:358-372

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Harris, C. C. (1985). "Future directions in the use of DNA adducts as internal dosimeters for monitoring human exposure to environmental mutagens and carcinogens." Environmental health perspectives **62**: 185.
- Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Drossou, A., Pontikis, C., & Loukas, M. (2003). Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica*, 132(3), 279-286.
- K. Doi, M. Wei, M. Kitano, N. Uematsu, M. Inoue, and H. Wanibuchi, "Enhancement of preneoplastic lesion yield by Chios Mastic Gum in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 234, no. 1, pp. 135–142, 2009
- Kohn, K. W., J. A. Hartley, et al. (1987). "Mechanisms of DNA sequence selective alkylation of guanine-N7 positions by nitrogen mustards." Nucleic acids research **15**(24): 10531-10549.
- Krishna, G. and M. Hayashi (2000). "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **455**(1): 155-166..
- Kumari, M., A. Mukherjee, et al. (2009). "Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*." Science of the Total Environment **407**(19): 5243-5246.
- Lata, S., S. Singh, et al. (2014). "Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective effect of *Phyllanthus fraternus* against a chemotherapeutic drug cyclophosphamide." Applied biochemistry and biotechnology **173**(8): 2163-2173.
- Launay, A. (2013). "Médicaments et Oncopédiatrie: Amélioration des conditions de conservation et de dispensation de la solution buvable de méthotrexate dosée à 2 mg/mL réalisée au CHU d'Angers."

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Le Blanc, G. A. and D. J. Waxman (1989). "Interaction of anticancer drugs with hepatic monooxygenase enzymes." Drug metabolism reviews **20**(2-4): 395-439.
- Lev E and Amar Z (2002). Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. J Ethnopharmacol, 82, 131-145.
- Liu, M., B. F. Hales, et al. (2014). "Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line." Biology of reproduction **90**(4): 72.
- Marinello, A., S. Bansal, et al. (1984). "Metabolism and binding of cyclophosphamide and its metabolite acrolein to rat hepatic microsomal cytochrome P-450." Cancer research **44**(10): 4615-4621.
- Marner, F.-J., A. Freyer, et al. (1991). "Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*." Phytochemistry **30**(11): 3709-3712.
- Mateuca, R., N. Lombaert, et al. (2006). "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring." Biochimie **88**(11): 1515-1531.
- Moore, M. J. (1991). "Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide." Clinical pharmacokinetics **20**(3): 194-208.
- Moore, M. J. and C. Erlichman (1998). "Pharmacology of anticancer drugs." The basic science of oncology **3**(1): 371-391..
- NAGATA, H., S. TAKEKOSHI, et al. (1999). "Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase." Tokai journal of experimental and clinical medicine **24**(1): 1-11.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nau, H., H. Spielmann, et al. (1982). "Mutagenic, teratogenic and pharmacokinetic properties of cyclophosphamide and some of its deuterated derivatives." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **95**(2-3): 105-118.
- Ohta, T. (1993). "Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives." Critical reviews in toxicology **23**(2): 127-146.
- Patel, J. M. and E. R. Block (1985). "Cyclophosphamide-induced depression of the antioxidant defense mechanisms of the lung." Experimental lung research **8**(2-3): 153-165.
- Pool-Zobel, B., A. Bub, et al. (1999). "Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells." European journal of nutrition **38**(5): 227-234.
- Preston, R. J., B. J. Dean, et al. (1987). "Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells." Mutation Research/Genetic Toxicology **189**(2): 157-165.
- Quézel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales-v. 1-2.
- Quiles, J. L., J. R. Huertas, et al. (2002). "Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity." Toxicology **180**(1): 79-95.
- Rameau, J.-C., D. Mansion, et al. (1989). Flore forestière française : guide écologique illustré. Paris, Institut pour le développement forestier : Ministère de l'agriculture et de la forêt, Direction de l'espace rural et de la forêt : Ecole nationale du génie rural, des eaux et des forêts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Raja, W., R. Agrawal, et al. (2010). "Effects of Solanum lycopersicum Fruit Extract on."
- Cyclophosphamide-induced chromosome aberrations in mouse bone marrow cells." Pharmacologyonline **1**: 909-914.
- Remila, S., D. Atmani-Kilani, et al. (2015). "Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts." European Journal of Integrative Medicine **7**(3): 274-286.
- Russo, J. E., J. Hilton, et al. (1989). "The role of aldehyde dehydrogenase isozymes in cellular resistance to the alkylating agent cyclophosphamide." Progress in clinical and biological research **290**: 65.
- Sakaguchi, N., M. Inoue, et al. (1998). "Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid." Biochemical pharmacology **55**(12): 1973-1981.
- Sharma, V. and R. Agrawal (2015). "Evaluation of Anticlastogenic effects of Glycyrrhiza glabra root extract against Cyclophosphamide induced Chromosomal aberration in Swiss albino Mice." Journal of Applied Pharmaceutical Science **5**(6): 127-132.
- Salvadori, D. M., L. R. Ribeiro, et al. (1992). "The protective effect of β -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **265**(2): 237-244.
- Senapathy, J. G., S. Jayanthi, et al. (2011). "Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1, 2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats–A chemopreventive approach." Food and chemical toxicology **49**(4): 887-892.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Serrano, A., C. Palacios, et al. (1998). "Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation." Archives of biochemistry and biophysics 350(1): 49-54.
- Shambaugh, E. M. (1992). Self-instructional manual for tumor registrars, US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
- Sierra, L. M. and I. Gaivão (2014). Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach, Humana Press.
- Singal, P., T. Li, et al. (2000). "Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation." Molecular and cellular biochemistry 207(1-2): 77-86.
- Sladek, N., D. Doeden, et al. (1984). "Plasma concentrations of 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard in patients repeatedly given high doses of cyclophosphamide in preparation for bone marrow transplantation." Cancer treatment reports 68(10): 1247-1254.
- Slapšytė, G., J. Mierauskienė, et al. (2013). "Modifying effect of vitamin e on adriamycin and cyclophosphamide induced genotoxicity and antioxidant status in rats." Veterinarija ir Zootechnika 65(87).
- Soleas, G. J., L. Grass, et al. (2002). "A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols." Clinical biochemistry 35(2): 119-124.
- Soria, J.-C., S. Vignot, et al. (2014). "Cours de chimiothérapie antitumorale et traitement médical du cancer-XXVIIIe cours de Gustave-Roussy."
- Soussi, T. (2000). "Cycle cellulaire et apoptose: le gène suppresseur de tumeur p53."

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sponchiado, G., M. L. Adam, et al. (2016). "Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review." Journal of Ethnopharmacology **178**: 289-296.
- S. Magkouta, G. T. Stathopoulos, I. Psallidas et al., "Protective effects of mastic oil from *Pistacia lentiscus* variation chia against experimental growth of lewis lung carcinoma," *Nutrition and Cancer*, vol. 61, no. 5, pp. 640–648, 2009.
- Taha, N. R., H. A. Amin, et al. (2015). "The protective effect of *Moringa oleifera* leaves against cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats." Tissue and Cell **47**(1): 94-104.
- Thompson, M., C. Williams, et al. (1976). "Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity." Analytica Chimica Acta **85**(2): 375-381.
- Tijjing, L. D., J.-S. Choi, et al. (2014). "Recent progress of membrane distillation using electrospun nanofibrous membrane." Journal of Membrane Science **453**: 435-462.
- Trabelsi, H., O. A. Cherif, et al. (2012). "Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia." Food Chemistry **131**(2): 434-440.
- Uddin, S. and M. A. Choudhry (1995). "Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia cells." Biochemistry and molecular biology international **36**(3): 545-550.
- Villar A, Sanz M J and Payo M (1987). Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. Int J Crude Drug Res, 25, 1-3.
- Vuillet-A-Ciles, H., A. Lagarde, et al. (2014). "La chimiothérapie cytotoxique." Actualités Pharmaceutiques **53**(540): 16-24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang, I.-K., S.-Y. Lin-Shiau, et al. (1999). "Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells." European Journal of Cancer **35**(10): 1517-1525.
- Wrabetz, E., G. Peter, et al. (1980). "Does acrolein contribute to the cytotoxicity of cyclophosphamide?" Journal of cancer research and clinical oncology **98**(2): 119.
- Xie, L., Yang, Z.-Y., Wen, J., Li, D.-Z., & Yi, T.-S. (2014). Biogeographic history of *Pistacia* (Anacardiaceae), emphasizing the evolution of the Madrean-Tethyan and the eastern Asian-Tethyan disjunctions. Molecular phylogenetics and evolution, **77**, 136-146.
- Yadav, L., S. Khan, et al. (2014). "Influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in the evaluation of the genotoxicity of doxorubicin, cyclophosphamide and zidovudine in female mice." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **770**: 6-15.
- Yaniv, Z. and N. Dudai (2015). "Medicinal and aromatic plants of the Middle-East."
- Zahin, M., F. Aqil, et al. (2010). "Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **703**(2): 99-107.
- Zaid, H., A. Rayan, et al. (2010). "Cancer treatment by Greco-Arab and Islamic herbal medicine." The Open Nutraceuticals Journal **3**(1).
- Zhang, Q. H., C. F. Wu, et al. (2009). "Reduction of cyclophosphamide-induced DNA damage and apoptosis effects of ginsenoside Rb 1 on mouse bone marrow cells and peripheral blood leukocytes." Environmental Toxicology and Pharmacology **27**(3): 384-389.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SITES INTERNET :

- <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=846010>.

Résumé

Pistacia lentiscus est une plante médicinale de la famille des Anacardiaceae, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses effets thérapeutiques très diversifiés. Le but de ce travail est d'évaluer l'activité génotoxique et antigénotoxique de l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* sur le cancer secondaire induit par le cyclophosphamide chez des souris.

Le test d'aberration chromosomique a été effectué, les souris ont été traitées par le CMC (0.8%) seulement (témoin négatif), avec différentes concentrations d'extrait éthanolique (125, 250, 500 et 1000 mg/kg) pour l'étude génotoxique, et par l'extrait de graines et du cyclophosphamide pour l'étude antigénotoxique, à 250 mg/kg.

Une diminution significative du pourcentage d'aberrations chromosomiques, ainsi qu'une augmentation de l'indice mitotique ont prouvé l'activité antigénotoxique des extraits éthanolique de *P.lentiscus*.

Ces résultats s'appuient sur l'implication des composés phénoliques dans la réparation des dommages de l'ADN par leur activité scavenging des radicaux libres.

Mots clés: chimiothérapie, cyclophosphamide, aberrations chromosomique, génotoxicité, *Pistacia lentiscus*.

Abstract

Pistacia lentiscus, of the Anacardiaceae family, is a plant widely used in folk medicine, and has many therapeutic effects. This work was aimed to evaluate the genotoxic and antigenotoxic activity of ethanolic extract of *Pistacia lentiscus* seeds against secondary cancer induced by cyclophosphamide in bone marrow cells of mice.

The chromosomal aberration assay was used, mice were treated with CMC (0.8%) for the negative control, different concentrations of ethanolic extract (125, 250, 500 and 1000 mg/kg) for the genotoxic groups, and with seeds ethanolic extract and cyclophosphamide at 250 mg/kg, for the antigenotoxic activity.

A significant reduction of the chromosomal aberration and an increase of the mitotic index, proved the antigenotoxic effect of ethanolic extract of *P.lentiscus*.

These results are based on the implication of phenolic compounds in the compensation for the damage of the DNA by their free radical scavenging activity.

Key words: chemotherapy, cyclophosphamide, chromosomal aberration, genotoxicity, *Pistacia lentiscus*