

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico- chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée



Réf:.....

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

MASTER

Thème

**Effets protecteurs des feuilles et des écorces des
racines de *Pistacia lentiscus* sur le cancer secondaire
induit chez des souris par le cyclophosphamide**

Présenté par :

DEMBELE JEAN PIERRE & TOUATI ISLAM

Soutenu le : 15 Juin 2016 à 11h 00

Devant le jury composé de :

M ^{me} DEBBACHE N.	MCB	Présidente
M ^{me} RAHMANI-BERBOUCHA M.	MAA	Promotrice
M ^{me} BENSALEM S.	MAB	Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Nous remercions d'abord Dieu tout puissant, qui nous a permis de mener à bien ce travail.

*Nous adressons ensuite nos plus sincères remerciements à notre promotrice **M^{me} RAHMANI -BERBOUCHA M.** pour avoir accepté de nous encadrer et pour son caractère très compréhensif, sa patience, sa disponibilité, ses précieuses orientations, ses conseils hautement précieux ainsi que pour tout le temps qu'elle nous a consacré pour diriger ce travail.*

*Nous remercions également **M^{me} DEBBACHE N.** pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons beaucoup à remercier aussi **M^{me} BENSALÉM S.** pour avoir accepté d'être l'examinatrice de ce travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à **M^{elle} AYOUNI K.** pour ses conseils scientifiques toujours avisés, ses remarques, ses suggestions pertinentes et ses nombreux traits d'esprits.*

*Remerciements sincères à **M^{elle} BOUGUELLID G.** (toujours souriante) de nous avoir fait bénéficier de sa grande expérience en détection d'aberrations chromosomiques et de gavage de souris ainsi que pour sa disponibilité inconditionnelle et ses nombreux conseils très utiles.*

*Nous tenons énormément à adresser nos profonds remerciements à **M^{me} ATMANI D.** de nous avoir permis de réaliser la pratique de notre mémoire au sein du laboratoire de Biochimie et génétique moléculaire dont elle est à la tête.*

Nous remercions tous ceux et celles qui nous ont marqués par leur soutien et encouragements : tous les membres de notre laboratoire et tous les collègues de la promotion, nous leur exprimons nos respects et nos profondes sympathies.

Enfin nos sentiments de reconnaissance et remerciements vont à toutes les personnes qui ont participées de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

A mes parents

Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien et leurs encouragements.

A mon très cher père DEMBELE Jules

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, le dévouement et l'immense respect que j'ai pour toi. Rien ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère DIARRA Catherine

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi. Tes prières et tes bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous tes sacrifices que tu n'as cessé de nous donner moi et mes frères et sœurs. Tu as fait tout ce qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes chers frères Charles et You-Moon Emmanuel ainsi qu'à mes sœurs Marie,

Un-Ho Rebecca, Mo-Won Marguerite et Moon-Wan Célestine

Puisse Dieu faire que cette fraternité perdure.

A tous les membres de ma famille éloignés ou proches

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mon cher Binôme Touati Islam et toute sa famille

A tous mes ami(e)s et camarades de promotion

En souvenir des bons moments passés ensemble dans une atmosphère de fraternité et d'entente sympathique.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

*A mes très chers parents ainsi que ma grande mère,
que dieu les gardes encore longtemps.*

A ma chère sœur unique.

*A toute la famille : mes oncles, mes tantes, les cousins
et cousines.*

*Je cite particulièrement mon collègue **DEMBELE***

Jean Pierre et sa famille.

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.*

ISLAM

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION	01
--------------------	----

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1-CANCER ET CHIMIOThERAPIE	02
I.1.1- GENERALITE SUR LE CANCER.....	02
I.1.2- CHIRURGIE.....	03
I.1.3- RADIOTHERAPIE.....	03
I.1.4- IMMUNOTHERAPIE.....	03
I.1.5- CHIMIOThERAPIE.....	04
I.1.5.1- INHIBITEURS DES TOPO-ISOMERASES.	04
I.1.5.2- ANTI-METABOLIQUES.	04
I.1.5.3- POISONS DU FUSEAU.	04
I.1.5.4- AGENTS ALKYLANTS.	05
I.1.6- GENERALITE SUR LE CYCLOPHOSPHAMIDE	06
I.1.6.1- PHARMACOCINETIQUE DU CYCLOPHOSPHAMIDE	06
I.1.6.2- DEVENIR DES METABOLITES ACTIFS DU CYCLOPHOSPHAMIDE	08
I.2- PHYThOTHERAPIE	13
I.3- DESCRIPTION BOTANIQUE DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	15
I.3.1- DESCRIPTION.....	15
I.3.2- CLASSIFICATION TAXONOMIQUE.....	16
I.3.3- DISTRIBUTION.....	16

I.3.4- UTILISATIONS	16
I.3.5- COMPOSES PHYTOCHIMIQUES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES	17

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II- MATERIEL ET METHODES	20
II.1- MATERIEL	20
II.1.1- MATERIEL VEGETAL	20
II.1.2- ANIMAUX TRAITES	20
II.1.3- PRODUITS CHIMIQUES	21
II.2- METHODES.....	21
II.2.1- SECHAGE BROyage ET TAMISAGE.....	21
II.2.2- EXTRACTION ET PREPARATION DES EXTRAITS ETHANOLIQUES.....	22
II.2.3- EVALUATION DE LA GENOTOXICITEE DES EXTRAITS DES FEUILLES ET DES ECORCES DES RACINES DE <i>P.LENTISCUS</i>	23
II.2.3.1- ADMINISTRATION DES EXTRAITS ETHANOLIQUES.....	23
II.2.3.2- SACRIFICE ET EXTRACTION DE LA MOELLE OSSEUSE.....	24
II.2.3.3- FIXATION ET COLORATION DES LAMES.....	25
II.2.3.4- EXAMEN MICROSCOPIQUE.....	26
II.2.4- ANALYSES STATISTIQUES.....	27

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III- RESULTATS ET DISCUSSION	28
III.1- RESULTATS ET INTERPRETATION.....	28
III.1.1- INDUCTION DE LA GENOTOXICITE PAR LE MUTAGENE.....	28
III.1.1.1- INDICES MITOTIQUES	28

III.1.1.2- POURCENTAGES DE CELLULES ABERRANTES	28
III.1.1.3-TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES.	29
III.1.2- EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES FEUILLES DE <i>P.LENTISCUS</i> . 30	
III.1.2.1- INDICES MITOTIQUES.....	30
III.1.2.2- POURCENTAGES DES CELLULES ABERRANTES	31
III.1.2.3-TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES	32
III.1.3- EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES ECORCES DES RACINES DE <i>P. LENTISCUS</i>	33
III.1.3.1- INDICES MITOTIQUES.....	33
III.1.3.2- POURCENTAGES DES CELLULES ABERRANTES..	34
III.1.3.3-TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES..	35
III.1.4- EVALUATION DE L'EFFET COMBINE DU MUTAGENE ET LES DEUX PARTIES DES EXTRAITS DE <i>P.LENTISCUS</i>	36
III.1.4.1- POURCENTAGES DES INDICES MITOTIQUES	36
III.1.4.2- POURCENTAGES DES CELLULES ABERRANTES	37
III.1.4.3-TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES.....	38
III.2- DISCUSSION DES RESULTATS	41
CONCLUSION	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45
RESUME	

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Effets direct et indirect des radiations ionisantes sur l'ADN	03
02	Structure chimique des vinca alcaloïdes	05
03	Voies métaboliques du CP	07
04	Voies d'élimination du CP	08
05	Mécanisme d'alkylation du nitrogène moutarde dans l'ADN	09
06	Mécanisme de formation du γ -OH-Acr-dG par l'acroléine	10
07	Liaison du N ² -(3-oxopropyl)-desoxy guanine avec une cytosine et un peptide	10
08	Liaison de l'acroléine avec la cystéine, arginine et la lysine	11
09	Photographies originales des feuilles, fruits et branches de <i>Pistacia lentiscus</i>	15
10	Distribution de <i>Pistacia lentiscus</i> autour du littoral méditerranéen	16
11	Photographies des feuilles et des écorces des racines de <i>P.lentiscus</i>	20
12	Photographies des souris au niveau de l'animalerie de l'université de Bejaia	21
13	Différentes étapes de préparation des extraits éthanoliques des feuilles de <i>P.lentiscus</i>	22
14	Etapes de la solubilisation des extraits éthanoliques	22
15	Photographie originale de gavage d'une souris	24
16	Photographie original d'une injection IP et d'une dislocation cervicale	24
17	Photographies originale des étapes d'extraction du fémur	25
18	Coloration des lames	25
19	Montage des lames et les lamelles	26
20	Microscope optiques et la métaphase spread observée au G x 40 accompagné des cellules en interphase (rose foncé, petite) et cellules en divisions (rose clair, grosse)	26
21	Histogramme comparatif des pourcentages d'indice mitotique des témoins négatifs (CMC 0.8%) et positifs (CP 50 mg/kg)	28
22	Histogramme comparatif des pourcentages des cellules aberrants des témoins négative (CMC 0.8%) et témoin positif (CP 50 mg/kg)	29

23	Histogramme représentatif des pourcentages des indices mitotiques des extraits des feuilles de <i>P.lentiscus</i> de 250, 500,1000mg/kg chez les males et femelles	31
24	Histogramme représentatif des pourcentages des cellules aberrantes des extraits des feuilles de <i>P.lentiscus</i> de 250, 500,1000mg/kg chez les males et femelles	32
25	Histogramme comparatif des pourcentages des cellules aberrants des témoins négative (CMC 0.8%) et témoin positif (CP 50 mg/kg)	34
26	Représentation graphiques des pourcentages des indices mitotiques des extraits des écorces des racines de <i>P.lentiscus</i> de 250, 500,1000mg/kg	35
27	Représentation graphiques des pourcentages des indices mitotiques des extraits des feuilles et les écorces des racines de <i>P.lentiscus</i> de 250mg/kg combiné à l'agent mutagène	37
28	Représentation graphiques des pourcentages des cellules aberrants des extraits des feuilles et écorces des racines de <i>P.lentiscus</i> de 250mg/kg combiné au mutagène	38
29	Photographies originales des différentes aberrations chromosomiques. 1 :Gap , 2 : polyploïdie, 3 :Association centromérique , 4 :Pulvérisation, 5 :Délétion chromosomique ,6 : fragment , 7 :Anneau	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Impact de l'acroléine sur différentes protéines	12
II	Plantes médicinales et leurs modes d'actions sur le CP	14
III	Composés retrouvés chez <i>Pistacia Lentiscus</i> et leurs activités	18
IV	Tableau récapitulatif des différents traitements réalisés sur les souris	23
V	Différents types et fréquences des aberrations chromosomiques chez les deux témoins négatif et positif	30
VI	Différents types et fréquences des aberrations chromosomiques provoquée par les feuilles de <i>P.lentiscus</i>	33
VII	Différents types et fréquences d'aberrations chromosomiques provoquer par les extraits des écorces des racines <i>P.lentiscus</i>	36
VIII	Différents types et fréquences d'aberrations chromosomiques observées chez les groupes anti génotoxiques des feuilles et des écorces des racines de <i>P.lentiscus</i>	39

LISTE DES ABERVIATIONS

4-OH-CP : 4-hydroxy-cyclophosphamide

5-FU : 5 fluoro-uracile

AC : Aberration chromosomiques

ADH : Alcool déshydrogénases

ADN : Acide désoxyribonucléotide

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

ARN: Acide ribonucléique

BER : Base excision repair

CMC : Carboxy methylcellulose

CP : Cyclophosphamide

CYP : Cytochrome p450 hépatique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FDP lysine : N ε - (3-formyl-3,4-dehydropropiperidino) lysine

GPX : La glutathion peroxydase

GSH : La glutathion réduite

GST : Glutathion-S-Transférase

IM : Indice mitotique

KCl : Chlorure de potassium

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

MMR: Mismatch repair

NER: Nucleotide excision repair

NFκB: Nuclear Factor-kappa B

NMRI: Souris de type (Naval Medical Research Institute).

NRF2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

OMS : Organisation mondiale de la santé

P53 : Protéine 53 KDa

PA : Pourcentage des cellules aberrantes

pH : Potentiel d'hydrogène

rpm : Rotation par minute

SOD: La superoxyde dismutase

TRX: Thioredoxine

TrxR: Thioredoxine réductase

α -OH-Acr-dG : α -hydroxy-1, N²-propanodésoxyguanosine

γ -OH-Acr-dG : γ -hydroxy-1, N²-propanodésoxyguanosine

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer est une des causes majeures de décès dans le monde. On estime à plus de 11 millions de personnes diagnostiquées avec un cancer et cette maladie est à l'origine de plus de 8,2 millions de décès en 2012, soit 13% de la mortalité mondiale. En Algérie, le taux de personnes atteintes par cette maladie est passé de 27.775 en l'an 2000 à 480.000 en 2014 (**Zitouni, 2014**) et le taux de décès était de 219.000 personnes en 2014. Malgré les nombreuses avancées de la médecine dans la lutte contre le cancer, elle reste toutefois un problème sanitaire majeur. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le cancer comme « un terme général s'appliquant à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme ». C'est cette grande diversité qui explique, en partie, la difficulté à trouver un remède universel et efficace.

Il existe trois modalités principales de traitement des cancers : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. C'est ce dernier mode de traitement qui a retenu notre attention et plus particulièrement une classe d'agents chimiothérapeutiques : les moutardes à l'azote dont la molécule la plus utilisée est le cyclophosphamide. Cependant l'inconvénient majeur de ces thérapies est le manque de spécificité car elles détruisent à la fois les cellules cancéreuses et les cellules saines ce qui entraîne de nombreux effets secondaires (**Baudisson, 2006**). Pour pallier à ces problèmes, de nouvelles thérapies ont été développées telle que la phytothérapie (médication par les plantes) car elle propose des remèdes naturels et bien tolérés par l'organisme. L'action des plantes sur l'organisme dépend de leur composition en métabolites secondaires. (**Abdelwahed et al., 2006; Hertzog et Tica, 2012; Taylor et al., 2014; Farhan et al., 2016**).

La plante *Pistacia lentiscus* est l'une des plantes utilisées pour ses vertus en médecine traditionnelle aussi bien en Algérie que dans tous les pays du pourtour méditerranéen. En effet elle est douée de plusieurs activités biologiques, notamment anti oxydante (**Barotto et al., 2013**), anti inflammatoire et anti cancéreuse (**Remila et al., 2015**).

Toutes fois, même si ces évidences scientifiques existent, son utilisation doit être accompagnée d'une étude de cytotoxicité afin de confirmer son utilisation à long terme.

C'est dans ce contexte que la présente étude a été menée afin d'évaluer les effets protecteurs des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* sur la génotoxicité induite par le cyclophosphamide *in vivo* ainsi que ses éventuels effets génotoxiques.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- CANCER ET CHIMIOThERAPIE

I.1.1- GENERALITE SUR LE CANCER

Les milliards de cellules qui constituent les différents tissus de l'organisme naissent et meurent de façon à maintenir la forme, l'architecture et les fonctions propres à chaque organe ou système, et ce grâce à des mécanismes finement contrôlés. Cependant, il arrive que quelques-unes échappent à ces mécanismes et entament des processus de proliférations anarchiques, tout d'abord au sein de leur tissu d'origine et qui s'étend par la suite dans les tissus voisins sous forme de métastase, on parle alors de cancer (**Biyi et al., 1998**).

Le cancer est une prolifération de cellules anormales, qui tend à envahir et à détruire les tissus voisins et à essaimer à distance (**Rouesse, 2011**). L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales, qui peuvent diffuser dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases

Le cancer résulte d'altérations génétiques, le processus de cancérisation est dû à l'accumulation d'évènements génétiques (altération du génome), qui conduisent à des modifications qualitatives (mutations) ou quantitatives (amplification, c'est à dire augmentation du nombre de copies) de certains gènes et donc des protéines qu'ils codent. Ces altérations génétiques perturbent l'équilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire, touchant ainsi les gènes intervenants dans la transduction du signal, les facteurs de croissance, les récepteurs des facteurs de croissance (proto-oncogènes), et ceux responsables du contrôle du génome (gènes suppresseurs de tumeur), comme la p53 (**William, 2006**).

Sous l'effet de facteurs de l'environnement tels que le tabac, le soleil, certains agents chimiques ou physiques, certains virus, ou spontanément, le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées. Si le système de réparation est défectueux ou dépassé, la cellule conserve ces altérations et devient anormale. Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation et s'engage alors, dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement du cancer (**Pelli, 2005**).

Le traitement du cancer est, au mieux, d'obtenir la guérison ou, à défaut, de stopper l'évolution le plus longtemps possible, tout en atténuant les symptômes de la maladie. Il existe deux grandes modalités de traitement du cancer : les traitements à visée locorégionale (chirurgie, radiothérapie) et les traitements médicaux systémiques tels que l'immunothérapie et la chimiothérapie. Ces traitements sont utilisés seuls ou, le plus souvent, en association.

I.1.2- CHIRURGIE

L'opération chirurgicale est la forme la plus ancienne et fréquente, qui permet de traiter les cancers. Elle consiste à l'ablation du tissu touché par la tumeur ainsi qu'une marge de tissus sains autour d'elle (Leroy, 2006; Anonyme, 2009).

I.1.3- RADIOTHERAPIE

Elle représente un traitement classique des cancers, son but est d'utiliser les radiations ionisantes à visée thérapeutique, afin de détruire les cellules cancéreuses. Son principe consiste à provoquer des lésions d'acide désoxyribonucléotide (ADN) dans les cellules cibles, soit indirectement par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) formées par les électrons libérés par les rayonnements ionisants, soit directement par ces électrons (Figure 01) (Rossi, 2010).

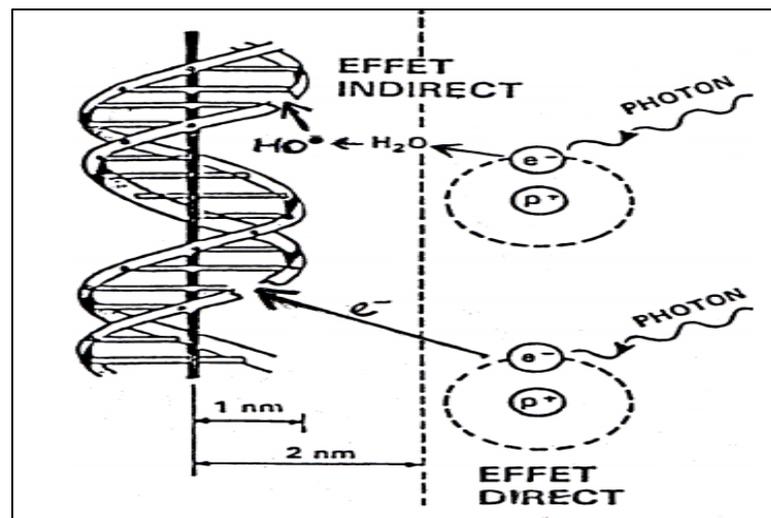


Figure 01 : Effets direct et indirect des radiations ionisantes sur l'ADN (Rossi, 2010).

I.1.4- IMMUNOTHERAPIE

L'immunothérapie est un traitement qui consiste à administrer des substances chez le patient, dans le but de prévenir ou de stimuler les défenses de l'organisme (le système immunitaire), contre les cellules cancéreuses précoces et métastatiques (Anonyme, 2009).

I.1.5- CHIMIOTHERAPIE

Le terme de « chimiothérapie » désigne l'ensemble des traitements utilisant une molécule chimique administrée par différentes voies, à visée thérapeutique (**Leroy, 2006**). Elle fait partie des traitements généraux ou bien systémique. Dans le cas du traitement de cancer, on utilise la chimiothérapie anticancéreuse. Son principe est d'induire des lésions létales en agissant sur les mécanismes de la division cellulaire (**Anonyme, 2010**).

On distingue plusieurs types de chimiothérapies, en fonction du mécanisme d'action des molécules, à savoir les inhibiteurs des topo-isomérases, les anti-métabolites, les poisons du fuseau et les agents alkylants.

I.1.5.1- INHIBITEURS DES TOPO-ISOMERASES

Les topo-isomérases sont des enzymes qui modifient la topologie de l'ADN. Elles provoquent le relâchement de l'ADN surenroulé, par une rupture transitoire d'un ou des brins de celui-ci (**Roger, 2005**).

Les inhibiteurs des topo-isomérases (exemple : la doxorubicine) sont des molécules naturelles produites par les micro-organismes. Leur action cytotoxique commune se manifeste par une intercalation dans l'ADN entre les paires de bases adjacentes ; ce qui entraîne une stabilisation des complexes clivables ADN-topo-isomérase, provoquant ainsi des coupures non réparables et empêchant cette refermeture. Ces lésions perturbent par la suite le phénomène de réplication et de transcription, ce qui provoque la mort cellulaire (**Chauveragne et Hoerni, 2001**).

I.1.5.2- ANTI-METABOLIQUES

Les anti-métabolites, à l'instar du 5 fluoro-uracile (5FU), sont des produits S dépendants, leurs structures chimiques sont voisines de certaines molécules nécessaires à la synthèse des acides nucléiques. Ils agissent sur des enzymes spécifiques, soit en les inhibant ou bien en se complexant à elles, pour donner des molécules aberrantes non fonctionnelles (**Lanore et Delprat, 2007**), ce qui aboutit au freinage de la division cellulaire et stoppe la croissance tumorale (**Chauveragne et Hoerni, 2001**).

I.1.5.3- POISONS DU FUSEAU

Ils sont aussi appelés antimitotiques. Ce sont des substances végétales, qui altèrent le système microtubulaire du fuseau achromatique, conduisant à un blocage en métaphase. La cellule se dégénère alors ou bien elle présente un phénomène de polyploïdie, qui lui sera létale (**Chauveragne et Hoerni, 2001**).

Les molécules fréquemment utilisées dans cette classe sont la vinblastine et la vincristine. Ce sont des antimétopiques de la famille des vinca alcaloïdes, découverts en 1957 à partir des extraits de la pervenche de Madagascar (**Lanore et Delprat, 2007**). Ils forment un hétérodimère constitué par la catharantine et la vindoline et se distinguent par le radical R situé sur la vindoline (vinblastine R : CHO ; vincristine R : CH₃) (Figure 02) (**Jean François et al., 2011**).

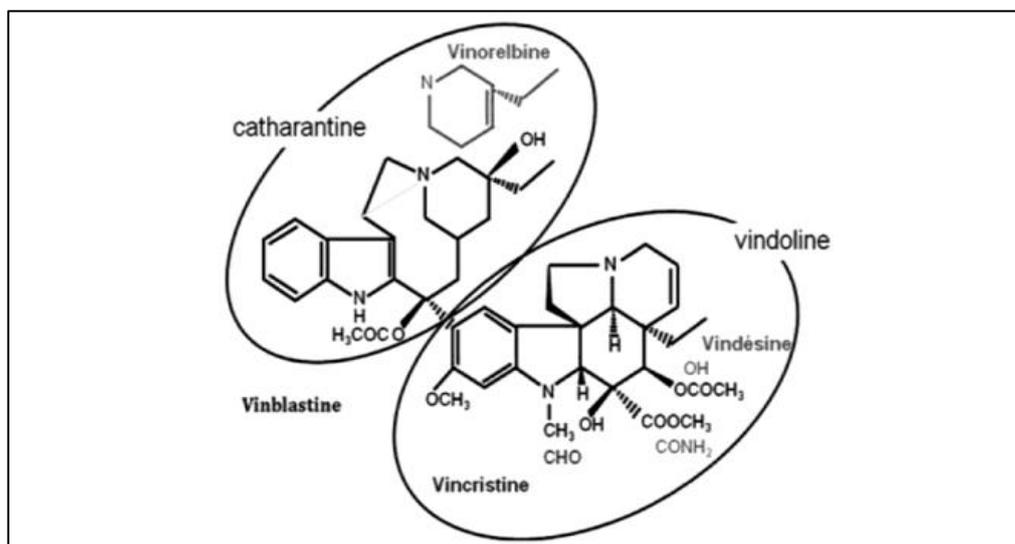


Figure 02 : Structure chimique des vinca alcaloïdes (**Jean François et al., 2011**).

Elles se conjuguent réversiblement à la tubuline (**Lanore et Delprat, 2007**), sur la sous unité β , mais sur un site différent de celui de la colchicine, le plus ancien des antimétopiques (**Jean François et al., 2011**). Elles inhibent ainsi la polymérisation des microtubules, ce qui conduit à l'impossibilité de la formation du fuseau achromatique (**Lanore et Delprat, 2007**).

I.1.5.5- AGENTS ALKYLANTS

La famille des alkylants reste à l'heure actuelle l'une des plus utilisée dans la chimiothérapie. Ils ne sont pas cycle dépendant et leurs cibles est la chaîne d'ADN ; ils se fixent sur les bases azotées de celle-ci par alkylation. Leurs sites préférentiels sont les atomes d'azote numéro 7 de la guanine (**Jean François et al., 2011**).

Les agents efficaces sont ceux qui possèdent 2 groupes alkyles séparés, car ils réalisent 2 liaisons covalentes avec deux bases guanines. Les ponts intra- ou intercaténaires ainsi créés sur le génome bloquent la réplication de l'ADN et la transcription de l'ARN, ce qui entraîne la mort cellulaire par apoptose (**Laorne et Delpart, 2007**).

Les agents alkylants sont encore appelés antichromosomiens ou radiomimétiques en raison de l'apparente analogie de la dégradation chromosomique par les radiations ionisantes. Les déviations structurales, plus au moins considérables provoquent soit des mutations géniques, qui n'apparaissent qu'aux générations cellulaires ultérieures, soit des altérations morphologiques immédiatement perceptibles (**Chauveragne et Hoerni, 2001**). Le composé le plus utilisé dans cette famille en chimiothérapie est le cyclophosphamide (CP).

I.1.6- GENERALITE SUR LE CYCLOPHOSPHAMIDE

Avant l'invention du CP, en 1958 par Brock et ses collaborateurs, les premiers agents alkylants étaient synthétisés pendant la première guerre mondiale, notamment les gaz moutardes appelés aussi, moutarde au soufre ou ypérite. Les symptômes d'aplasie lymphoïde et de myélosuppression que présentaient les soldats exposés à cette moutarde ont attirés la communauté scientifique de l'époque à synthétiser des agents alkylants moins toxiques, à visée thérapeutique. Les moutardes au soufre ont été remplacées par des moutardes azotées, dont la méchloroéthamine était la première molécule synthétisée (**Jean François et al., 2011**).

Son inconvénient était sa courte demi-vie plasmatique et sa forte réactivité et toxicité au sang et aux cellules saines (**Georges, 1997**). Par la suite, d'autres modifications structurales, en liant la moutarde azotée au phosphore d'un cycle oxazaphosphorine, ont permis l'obtention d'une pro-drogue inactive appelée cyclophosphamide, qui sera activé par passage hépatique (**Diana et al., 1995; Georges 1997**).

I.1.6.1- PHARMACOCINETIQUE DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Le CP possède une absorption et une distribution très élevées, il se différencie par rapport aux autres agents alkylants par sa longue durée de demi-vie plasmatique, qui est en moyenne de 7 heures (**Georges, 1997**). Une minorité est éliminée par la suite sous forme inchangée (5 à 20%), le reste est transporté vers les hépatocytes (**Diana et al., 1995; Milly et al., 2005**).

Une fois arrivé au foie, le captage cellulaire hépatique de cet agent s'effectue vers l'intérieur de cet organe, grâce à des transporteurs physiologiques (**Georges, 1997**). La voie principale consiste à hydroxylé le CP par une enzyme appelée le cytochrome p450 hépatique (CYP). Différents types d'isoenzymes sont également impliqués dans cette réaction d'hydroxylation, à savoir CYP2A6, 2B1, 3A5, 2C9, 2C19, mais la CYP2B6 est majoritairement responsable de la formation du métabolite primaire actif, le 4-hydroxy

cyclophosphamide (4-OH-CP) (Diana *et al.*, 1995; Milly *et al.*, 2005) . Ce dernier va se retrouver en équilibre spontanément avec sa forme tautomère acyclique, appelée aldophosphamide (Michael *et al.*, 2003; Ashkan *et al.*, 2009), dont l'équilibre est orienté de façon prédominante vers le 4-OH-CPA, à pH physiologique (Diana *et al.*, 1995; Michael *et al.*, 2003) .

La solubilité élevée de ces deux substances leur permet de diffuser des hépatocytes vers le plasma et d'être distribuées vers l'ensemble de l'organisme pour atteindre les cellules cancéreuses. Une minorité d'entre elles restent dans le foie (Ashkan *et al.*, 2009).

Le 4-OH-CP se transforme en aldophosphamide dans la cellule cible, et produit de façon spontanée et équimolaire, la moutarde phosphoramide et un dérivé toxique appelé acroléine (Figure 03) (Michael *et al.*, 2003 ; Ashkan *et al.*, 2009).

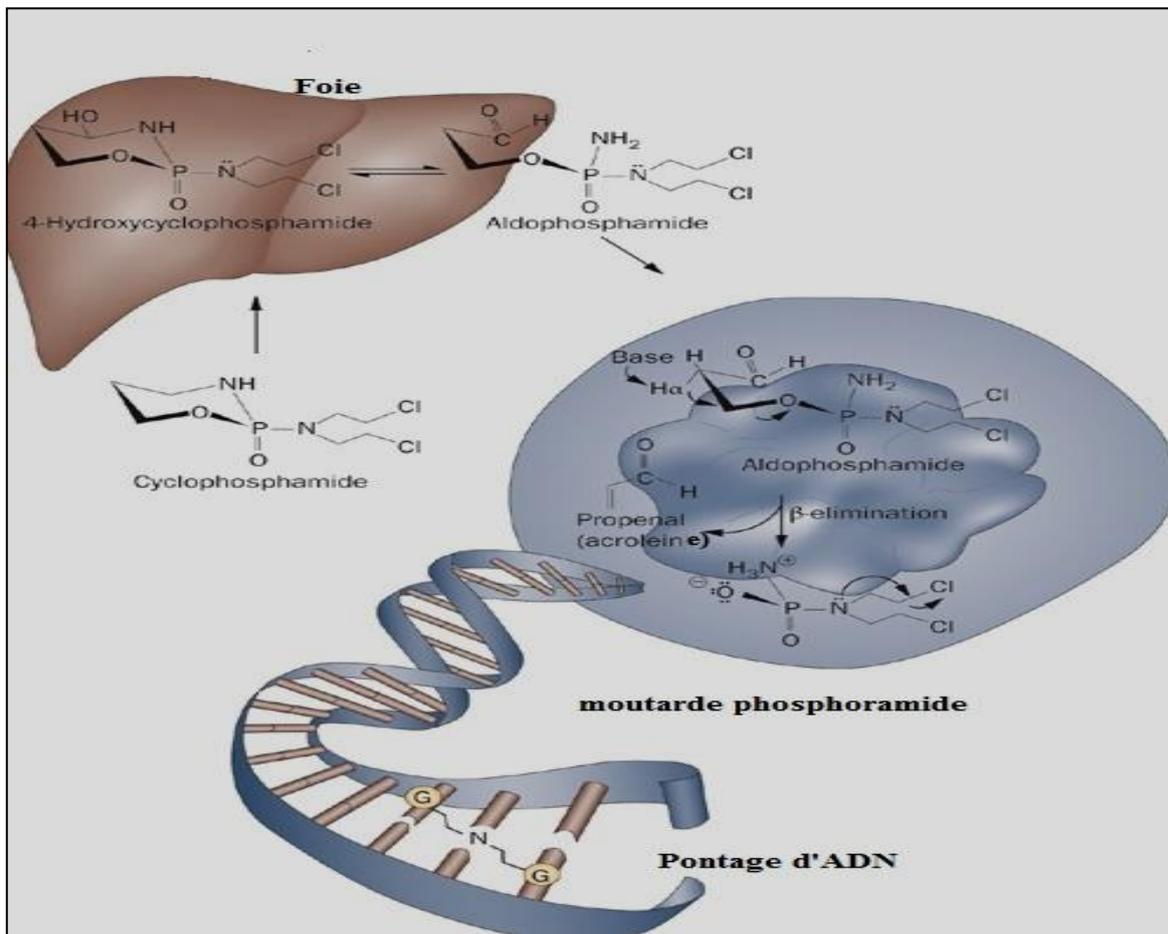


Figure 03 : Voies métaboliques du CP (Ashkan *et al.*, 2009) .

La voie d'élimination rend soit le CP ou ses métabolites primaires sous forme inactive (Figure 04), par l'intermédiaire des enzymes spécifiques de façon irréversible au niveau

hépatique, principalement (Milly *et al.*, 2005; Ashkan *et al.*, 2009). En effet, au niveau du foie le CP peut être inactivé par la CYP3A4 en 2-dechloroethylcyclophosphamide et en chloroacetaldehyde (5%). Par la suite, le 4-OH-CP peut être oxydé et inactivé par une Alcool déshydrogénase (ADH) en 4- kéto-cyclophosphamide (Milly *et al.*, 2005).

L'aldophosphamide est transformée en carboxyphosphamide par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) (Ashkan *et al.*, 2009), localisée au sein du cytosol des cellules hépatiques saines et faiblement dans les autres organes sains. L'ensemble de ces métabolites inactivés est majoritairement éliminé dans les urines (Milly *et al.*, 2005).

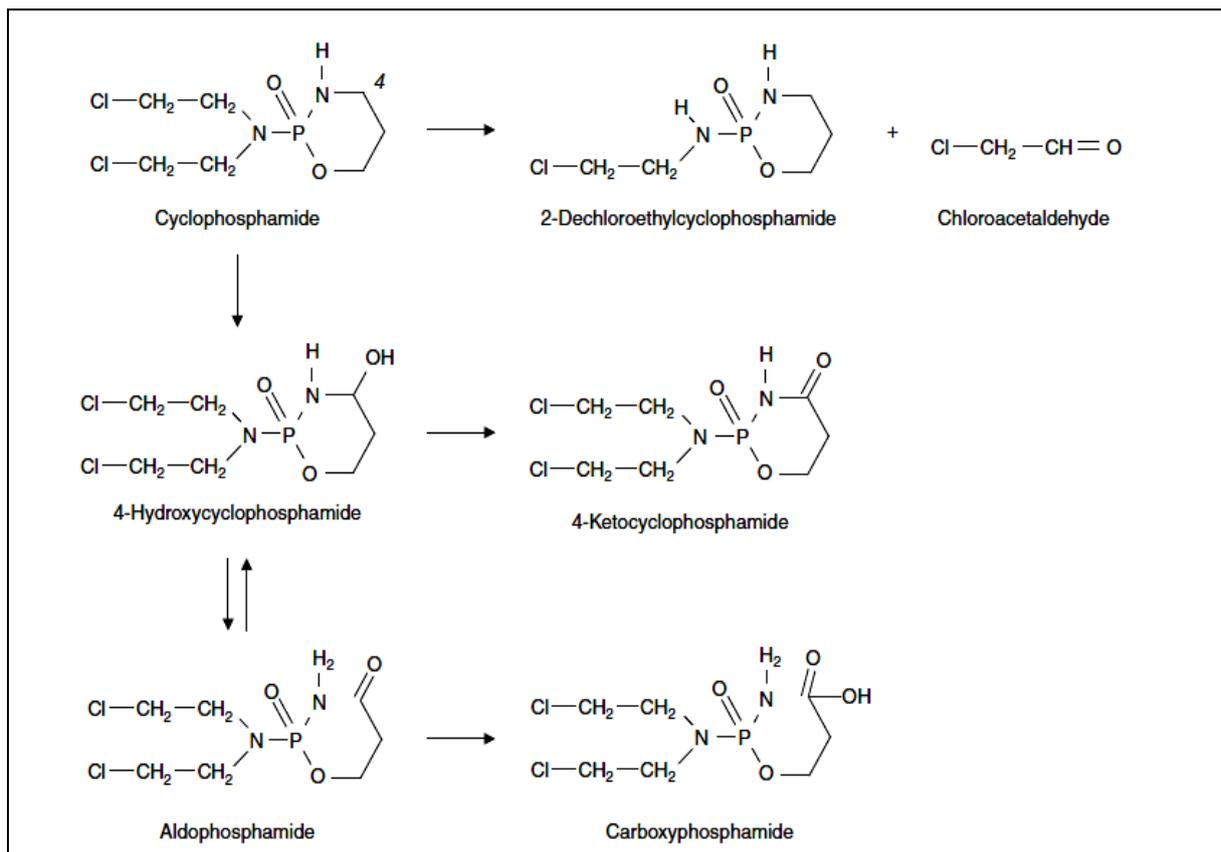


Figure 04 : Voies d'élimination du CP (Milly *et al.*, 2005).

I.1.6.2- DEVENIR DES METABOLITES ACTIFS DU CYCLOPHOSPHAMIDE

Le métabolite actif, moutarde phosphoramidate, subit une dernière biotransformation en nitrogène moutarde responsable de l'effet anti-néoplasique, par une réaction de désamination oxydative, au sein des cellules cancéreuses (Ashkan *et al.*, 2009; Anu, 2010). Par la suite,

l'alkylation des deux guanines sur le double brin d'ADN, par le nitrogène moutarde se déroule en deux étapes :

- L'activation : elle consiste à la libération de l'atome de chlore dans le premier bras (chloroéthyl) et formation dans le même bras par la suite, une cyclisation cationique appelée ion aziridinium, qui est un intermédiaire réactif.
- L'attaque : l'ion aziridinium cationique alkyle l'azote numéro 7 de la guanine du premier brin d'ADN (figure 05) (Anu, 2010).

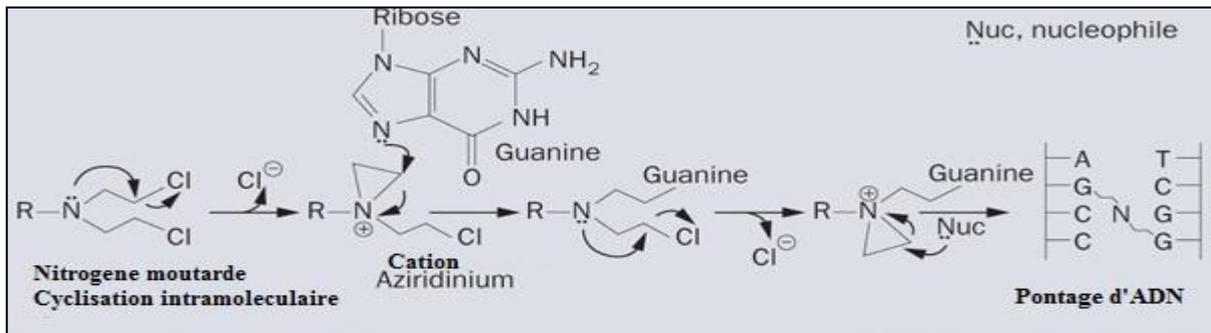


Figure 05 : Mécanisme d'alkylation du nitrogène moutarde dans l'ADN (Ashkan *et al.*, 2009).

Ces deux mêmes étapes se répètent pour le second brin du même ADN aboutissant à la formation d'un pont intracaténaire. Par la suite, cette alkylation rend les guanines chargées positivement, conduisant à une déstabilisation et formations des sites apuriques (Ashkan *et al.*, 2009).

L'acroléine, ce second métabolite, est un aldéhyde α, β insaturé, très électrophile réagit par réaction de Michael avec de nombreuses molécules nucléophiles dans les conditions physiologiques et responsable de la majorité des effets toxiques. Parmi les groupements nucléophiles les plus visés, les nucléotides d'ADN, d'acide ribonucléique (ARN) ou bien les acides aminés des protéines (INRS, 2015).

L'acroléine se fixe sur l'ensemble des bases azotées par une fréquence de 1 pour 1 000 nucléotides, dont la guanine est la plus exposée, car elle est plus nucléophile que les autres bases. Elles forment par la suite le α -hydroxy-1, N²-propanodésoxyguanosine (α -OH-Acr-dG) (5%) ou bien son isomère le γ -hydroxy-1, N²-propanodésoxyguanosine (γ -OH-Acr-dG) (95%) (Figure 06) (Hisang *et al.*, 2009).

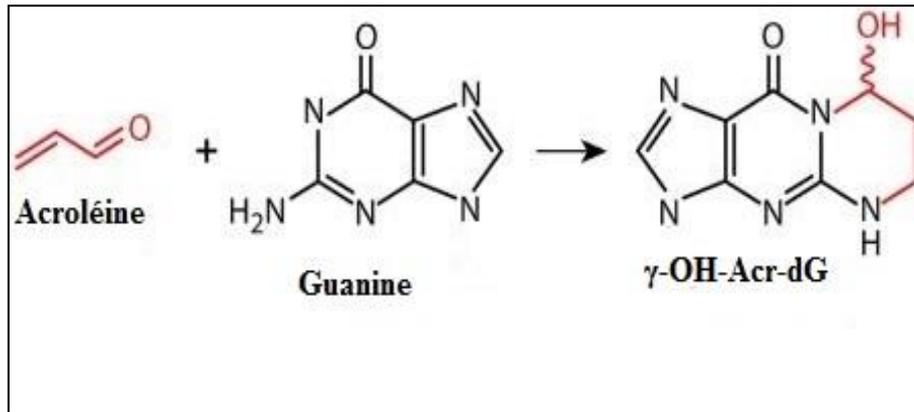


Figure 06 : Mécanisme de formation du γ -OH-Acr-dG par l'acroléine (**Hisang *et al.*, 2009**).

Hisang et ses collaborateurs (2009) ont démontré que γ -OH-Acr-dG provoque des mutations de type transversion de guanine à la thymine (50%) et des transitions de guanine à l'adénine (30%).

L'acroléine se lie aussi linéairement avec la guanine pour donner le N²-(3-oxopropyl)-désoxy guanine, qui forme d'une façon permanente une liaison hydrogène avec la cytosine et se fixe en même temps avec un peptide ou une protéine (**Figure 07**) (**Irina *et al.*, 2009**).

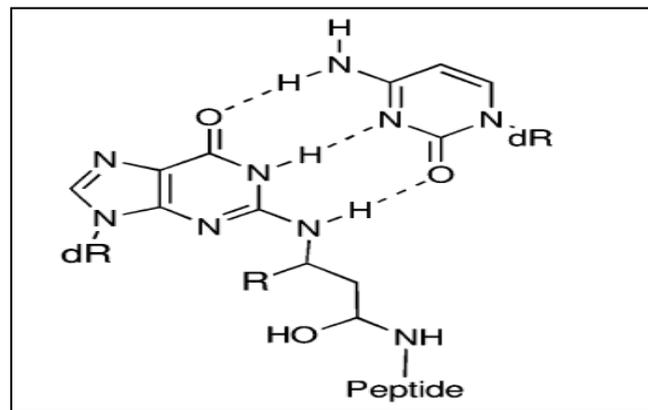


Figure 07 : Liaison du N²-(3-oxopropyl)-desoxy guanine avec une cytosine et un peptide (**Irina *et al.*, 2009**).

Parmi ces conséquences, on note la diminution de l'activité des ADN polymérases (**Munsch *et al.*, 1973 ; Irina *et al.*, 2009**) et les ARN polymérases (**Munsch *et al.*, 1973**), l'inhibition de l'expression de la protéine p53, par formation des adduits cycliques de guanine sur les points chauds du gène qui sont les codons 152, 154, 156, 157, et 158 de l'exon 5 ; les codons 248 et 249 de l'exon 7 et les codons 273 et 282 de l'exon 8 (**Feng *et al.*, 2006**).

L'acroléine réagit aussi avec les groupements nucléophiles thiol de la cystéine, amine de l'arginine et de lysine. Cette dernière subit une seconde réaction répétée pour former après élimination d'une molécule d'eau et cyclisation du groupement carbonyle, le N ϵ -3-formyl-3,4-dehydropropiperidino lysine (FDP lysine) (Figure 08). Elle réagit aussi avec le sélénium de l'acide aminé sélénocystéine (Charles *et al.*, 2011) et le noyau imidazole de l'histidine (Jan et Claudia, 2008). Par conséquent, les protéines ciblées par l'acroléine, via l'intermédiaire des acides aminés sont altérées.

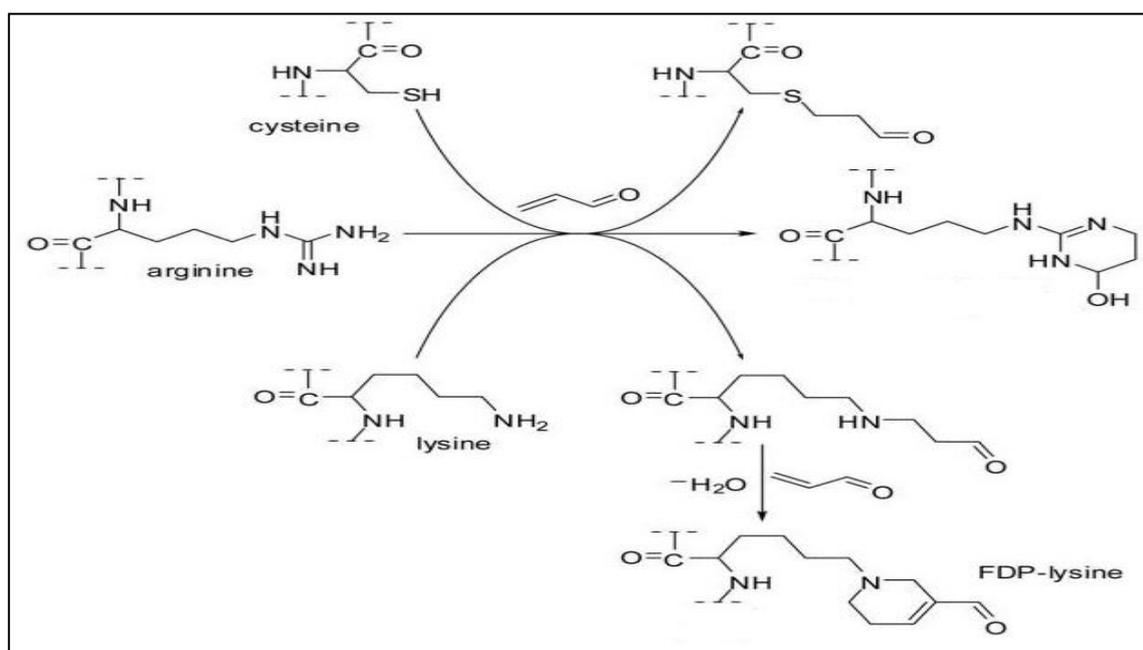


Figure 08 : Liaison de l'acroléine avec la cystéine, arginine et la lysine (Jan et Claudia, 2008).

Le tableau I résume l'impact de l'acroléine sur les activités des protéines touchées.

Tableau I : Impact de l'acroléine sur différentes protéines.

Protéine ciblée	Effet d'acroléine sur la protéine	Conséquences	Réf.
Les histones H3 et H4	Fixation de l'acroléine sur les lysines N-terminal cytosolique.	Inhibe l'acétylation des histones. Perturbe l'assemblage des nucléosomes, l'organisation de la chromatine et la transcription.	(Danqi <i>et al.</i> , 2013)
Les protéines responsables de la réparation d'ADN de type NER, BER, MMR	Fixation de l'acroléine sur les résidus cystéines, histidines, lysines.	Changement de la conformation des protéines, ce qui permet leurs inactivations et dégradations par les proteasomes par ubiquitination. Accumulation des mutations dans l'ADN.	(Hslang-Tsu <i>et al.</i> , 2012)
La Cu, Zn-super oxyde dismutase, (Cu, Zn-SOD)	Fixation d'acroléine sur les histidines qui forme le site actif (His46, 48, 63,120) et histidine portant le Cu et le Zn par un cluster bi caténaire (His 63).	L'inactivation et la réticulation de cet antioxydant. La libération du Cu et du Zn dans le cytosol et la non transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, ce qui favorise le stress oxydant.	(Jung, 2013)
La glutathion peroxydase (GPx ₁)	Formation d'adduit entre l'acroléine et le groupement sélénium cofacteur la Sélénocystéine. Formation d'adduit entre l'acroléine et les cystéines périphériques.	L'inactivation de cet antioxydant. Accumulation du pyroxyde d'hydrogène dans le cytosol mitochondrial et apparition du stress oxydant.	(Norbert <i>et al.</i> , 2012)
La glutathion (GSH)	Formation d'adduit entre la cystéine et l'acroléine.	L'inactivation de cet antioxydant et son élimination dans l'urine sous forme d'acide mercapturique. La diminution de la concentration de cette protéine dans l'organisme et apparition du stress oxydant.	(Jan et Claudia, 2008)
Le complexe enzymatique mitochondriale V (ATP synthase)	l'acroléine se fixe dans le complexe V (ATP synthase) sur les résidus cystéines 294 de la chaîne α , 78 de la chaîne γ , 239 de la chaîne B.	Modification et dysfonctionnement total de la mitochondrie.	(Jan et Claudia, 2008)
Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	Formation d'adduits entre les différentes cystéines, mais principalement la cystéine 151 et l'acroléine.	La libération du NRF ₂ du cytosol par son détachement du Keap1, son entrée dans le noyau et sa fixation sur l'élément de réponse antioxydant. L'expression de la GST et provoque l'inactivation des métabolites du cyclophosphamide et inhibition de concentration la GSH cellulaire.	(Jan et Claudia, 2008)
Le système thioredoxine	L'acroléine forme un adduit avec la Sélénocystéine de la thioredoxine (trxR) réductase en position 498, et la cystéine de la thioredoxine (trx) en position 62 et 69.	Perte de fonctionnalité de la trxR et trx. Oxydation et Inhibition de l'activité de peroxydoxine car elle ne sera pas réduite par la trx et accumulation du peroxyde d'hydrogène. La dissociation de la protéine apoptose signal régulation kinase (ASK) de la trx dans le cytosol, par la suite, la non réduction de la cystéine 62 de la sous unité p50 de la protéine NFkB par la trx la rend inactif, ce qui oriente la cellule vers l'apoptose.	(Charles <i>et al.</i> , 2011)

La perte des protéines responsables de la réparation d'ADN muté, l'altération des protéines antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, ainsi que l'accumulation du stress oxydant provoqué par cet aldéhyde toxique, au sein d'une cellule saine, réorientent cette dernière vers une cancérisation secondaire. D'où la nécessité de rechercher d'autres molécules naturelles à effets anticancéreux et protecteurs, aux moindres effets secondaires évitables lors d'une chimiothérapie.

I.2- PHYTOTHERAPIE

La phytothérapie consiste en l'usage des plantes pour la prévention ou le traitement des maladies. Elle est, aujourd'hui encore, la médecine la plus employée à travers le monde. En effet, les médicaments de synthèse entraînent dans l'organisme humain des désordres, qui ne sont pas toujours prévisibles ni contrôlables allant jusqu'à aboutir parfois à l'apparition de cancer secondaire. Plusieurs chercheurs se sont orientés vers les plantes médicinales et à l'exploitation de leurs substances naturelles, qui sont mieux tolérées par l'organisme. Les plantes sont utilisées en médecine depuis des millénaires dans le traitement de nombreuses maladies, telles que : diarrhée, toux, fortes migraines. En outre leur utilisation dans le traitement du cancer est aussi très répandue, à l'instar de la vinblastine et de la vincristine, qui sont des alcaloïdes extraits de *Catharantus roseus*, encore appelé pervenche de Madagascar (Ernest et Catling, 2000).

Les propriétés anti cancéreuses des plantes sont dues, en majeure partie, à leurs métabolites secondaires qui sont : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les polyphénols et les tanins. Ces derniers sont répartis entre les différentes parties de la plante à savoir les racines, les écorces ainsi que les feuilles où ils sont majoritaires en général. (Abdelwahed *et al.*, 2006; Hertzog et Tica 2012; Taylor *et al.*, 2014; Farhan *et al.*, 2016).

Le tableau II illustre quelques exemples de plantes médicinales possédant des propriétés anti cancéreuses, vis-à-vis, du CP ainsi que leurs mécanismes d'action probables.

Tableau II : Plantes médicinales et leurs modes d'actions sur le CP

Plante	Dose mg/kg	Molécules Bioactives	Mécanismes d'action	Réf
Genre citrus	200	Hesperidine	Forme des adduits avec l'acroléine.	(Weixin <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ginkgo biloba</i>	200	Flavonol glycosylée	Les flavonols inhibent compétitivement la CYP 2B6.	(Aik <i>et al.</i> , 2009)
<i>Camellia Sinensis</i>	250 et 500	Acide gallique et les dérivés galloyles.	Piègent l'acroléine et empêche le passage de l'acroléine à travers les membranes cytologiques.	(Hour <i>et al.</i> , 1999)
<i>Vaccinium corymbosum</i>	20 et 80	Anthocyanes	Les tannins sur exprime la MGMT enhancer pour éliminer l'alkylation de l'ADN.	(Yunen <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sanguisorba Radix</i>	20	Tannins	Agit sur la CYP 2B1 comme inhibiteur compétitif.	(Xiang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cymbopogon citratus</i>	80	Les mono terpènes	Inhibe les cassures d'ADN consécutives à la fixation de l'acroléine.	(De-Oliveira <i>et al.</i> , 1997)
<i>Eucalyptus globulus</i>	-	Acide ellagique	Inhibe les cassures d'ADN consécutives à la fixation de l'acroléine.	(Rehman <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aegle marmelos</i>	200,400 et 600	marmelosine	Inhibition des espèces réactives formées par le CP.	(Sushmach et Rudrama, 2015)

Pistacia lentiscus est l'une des plantes médicinales, caractéristique du bassin méditerranéen, a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs, via le monde, concernant la caractérisation phytochimique de ses constituants, ainsi que la validation scientifique de ses différentes propriétés biologiques, néanmoins aucune étude n'a été réalisée afin d'évaluer son effet géno-protecteur.

I.3- DESCRIPTION BOTANIQUE DE *PISTACIA LENTISCUS*

I.3.1- DESCRIPTION

Pistacia lentiscus est un arbuste appartenant à la famille des Anacardiaceae. Cet arbuste ne dépassant guère les 2.5 à 3 m de hauteur et peut vivre jusqu'à 100 ans. Il se distingue par son abondance en substance résineuse, à odeur forte et désagréable (**Bernard et Boullard, 1997**).

C'est un dicotylédone 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. Les branches tortueuses et pressées et forment une masse serrée. Les feuilles de leur part, sont persistantes, composées, possédant un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte (figure 09). Quant aux fleurs, elles sont unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe et très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. Les fleurs femelles sont vert jaunâtre et les fleurs males sont rouge foncé. Enfin, le fruit est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, remplie par nucléole de la même forme, d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité en automne (figure 09) (**More et White, 2005**).



Figure09 : Photographies originales des feuilles, fruits et branches de *Pistacia lentiscus*.

I.3.2- CLASSIFICATION TAXONOMIQUE

La taxonomie de *Pistacia lentiscus* est présentée ci-dessous (Yaaqobi *et al.*, 2009) .

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Ordre :	<i>Sapindales</i>
Famille :	<i>Anacardiaceae</i>
Genre :	<i>Pistacia</i>
Espèce:	<i>Pistacia lentiscus</i> .
Nom Binomial :	<i>Pistacia lentiscus</i> L

I.3.3- DISTRIBUTION

Pistacia lentiscus est une plante qui pousse généralement de manière sauvage dans les régions arides. Cependant elle fait partie de la flore de nombreuses régions méditerranéennes (figure10) (Castola *et al.*, 2000). En Algérie elle est localisée dans les maquis et garrigues, précisément dans le bassin de la Soummam, en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Belhadj, 2001).

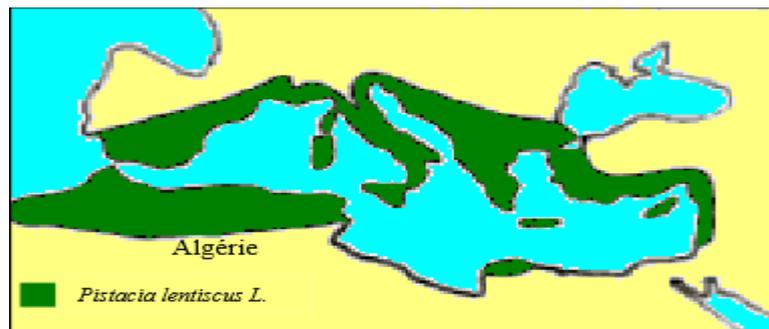


Figure 10: Distribution de *Pistacia lentiscus* autour du littoral méditerranéen (Seigue, 1985).

I.3.4- UTILISATIONS

Les utilisations de *Pistacia lentiscus* sont diverses et variées ; entre autre son bois est très apprécié en ébénisterie pour sa robustesse. Par ailleurs, l'huile essentielle, extraite à partir de ses différentes parties, est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, prescrites aussi pour traiter les problèmes veineux, dont les hémorroïdes. Aussi, l'huile du fruit comestible est couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage ainsi que dans la confection de savons (Seigue, 1985).

Ses parties aériennes sont utilisées traditionnellement dans le traitement de l'hypertension, grâce à ses propriétés diurétiques (**palevitch et Yaniv, 2000**).

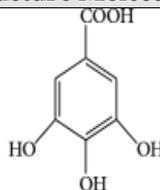
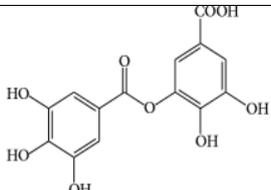
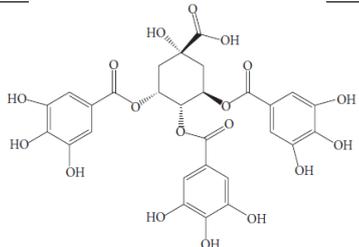
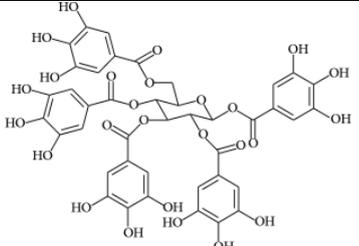
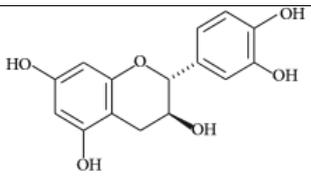
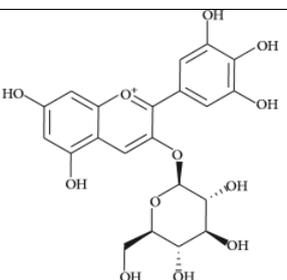
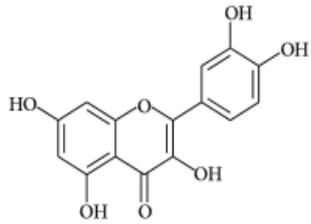
De plus, les feuilles sont utilisées dans le traitement de l'eczéma, la paralysie, la jaunisse, l'asthme, les infections de la gorge et les calculs rénaux. Elles ont également des propriétés anti inflammatoires et antipyrétiques (**Villard et al., 1987**).

Le mastic, de sa part, est utilisé contre les douleurs du haut de l'abdomen, la dyspepsie et les ulcères digestifs. Dans la médecine moderne, il trouve son application dans le traitement de l'ulcère duodénal (**Villard et al., 1987**). Il est connu également par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique (**Abdel Rahman et Soad, 1975; Magiatis et al., 1999; Dedoussis et al., 2004; Prichard, 2004**).

I.3.5- COMPOSES PHYTOCHIMIQUES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES

Plusieurs études menées sur les différentes parties de *Pistacia lentiscus* ont révélé la présence de nombreuses molécules présentant des activités biologiques bénéfiques. Le tableau III illustre quelques-unes d'entre elles.

Tableau III : Composés retrouvés chez *Pistacia lentiscus* et leurs activités .

Composé	Structure Moléculaire	Classe	Activités biologiques	Références
Acide Gallique		Acide phénolique	Anti oxydant Anti mutagénique Anti inflammatoire	(Abdelwahed <i>et al.</i> , 2006 ; Bhourri <i>et al.</i> , 2010)
Acide Di gallique		Acide phénolique	Anti oxydant Anti génotoxique	(Bhourri <i>et al.</i> , 2010)
Acide 3,4,5-Tri-O-galloyl Quinic		Tannin gallique	Anti tumorale	(Parker <i>et al.</i> , 1989)
1,2,3,4,6-Pentagalloyl Glucose		Tannin gallique	Anti oxydant Anti mutagénique	(Abdelwahed <i>et al.</i> , 2006)
catéchine		Flavan-3-ol	Anti oxydant Génotoxique Anti génotoxique Anti cancéreuse	(Claudia <i>et al.</i> , 2011 ; Farhan <i>et al.</i> , 2016)
Delphinidin-3-Oglucoside		anthocyanidine	Anti génotoxique Anti cancer Anti oxydant Anti inflammatoire	(Taylor <i>et al.</i> , 2014)
Quercétine		flavonol	Anti oxydant Anti inflammatoire Anti cancer Génotoxique et anti génotoxique	(Hertzog et Tica , 2012)

Par référence à ces différentes activités et vue que peu d'études ont été rapportées sur l'activité anti-cancéreuse de cette plante, notre intérêt s'est porté sur l'étude de ses effets génoprotecteurs, vis à vis, du cyclophosphamide, qui est une molécule très utilisée en chimiothérapie du cancer et dont les effets secondaires sont sans précédents.

*MATERIEL ET
METHODES*

II- MATERIEL ET METHODES**II.1- MATERIEL****II.1.1- MATERIEL VEGETAL**

Les feuilles et les écorces des racines de *Pistacia lentiscus* (Figure11) ont été récoltées et échantillonnées, aux mois de juin et octobre, respectivement, durant l'année 2013, dans la région de Barbacha, située au Sud de Bejaia, loin de tout impact de pollution.



Figure 11 : Photographies des feuilles et des écorces des racines de *P.lentiscus*.

II.1.2- ANIMAUX TRAITES

Des souris albinos NMRI (Naval Medical Research Institute), mâles et femelles, dont les poids varient entre 25 et 32g et âgées de 6 semaines, ont été utilisées pour étudier l'activité génotoxique et antigénotoxique des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*. Ces souris ont été obtenues, à partir de l'Institut Pasteur d'Alger, leurs élevages et l'expérimentation ont été effectués et réalisés, au sein de l'Animalerie de l'université A. Mira de Bejaia (Figure12). Ces animaux ont été mis sous des conditions de température ambiante (25-27°C) et un cycle de lumière, sous forme d'un éclairage artificiel de 12 heures par jour, dans le but de respecter leurs cycles biologiques. Elles ont été placées dans des cages de polypropylène, contenant des biberons remplis d'eau potable et nourris à volonté, à base de l'aliment standard de type bouchon (UAB EL KSEUR BEJAIA).



Figure 12 : Photographies des souris au niveau de l'animalerie de l'université de Bejaia.

II.1.3- PRODUITS CHIMIQUES

Les matériels chimiques utilisés dans cette étude sont décrits ci-dessous :

- Acide acétique, Colorant Giemsa, Carboxymethyl cellulose (CMC), Cyclophosphamide monohydrate, Ethanol 96%, Xylène (Sigma Aldrich, Etats-Unis).
- Chloroforme, Colchicine, Méthanol (Biochem Chemopharma, Québec).
- Chlorure de Potassium (KCL) (PRS Panreac, Espagne).
- Eurokitt 100ml (EMMONYA BIOTECH Ltd, Bulgarie).
- Huile d'immersion (Carl Zeiss, Allemagne).

II.2- METHODES

II.2.1- SECHAGE BROYAGE ET TAMISAGE

Les feuilles et l'écorce des racines de *P.lentiscus* ont été nettoyées des impuretés, puis séchées à l'ombre et à une température ambiante. Par la suite avant l'étape de broyage, les deux parties ont été séchées dans l'étuve (37°C), afin d'éliminer l'humidité restante. Les deux parties de la plante ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisées via un tamiseur pour obtenir une poudre fine, qui a été stockée à l'abri de la lumière à 4°C .

II.2.2- EXTRACTION ET PREPARATION DES EXTRAITS ETHANOLIQUES

Une extraction solide-liquide a été réalisée selon le protocole de **Atmani et ses collaborateurs (2009)**. Les deux parties de la plante, *P.lentiscus*, sous forme de poudre fine ont été macérées séparément dans éthanol (95%), avec un rapport de 1g de poudre pour 4 ml d'éthanol pendant 24 h sous agitation. Après décantation, les surnageant ont été filtrés et mis à évaporation totale dans les boîtes de pétri à l'intérieur de l'étuve à une température de 40°C, jusqu'à stabilisation complète du poids sec. Les deux extraits éthanoliques obtenus ont été conservés à -20°C, jusqu'à l'utilisation (Figure 13).



Figure 13 : Différentes étapes de préparation des extraits éthanoliques des feuilles de *P.lentiscus* (original).

Avant l'expérimentation cytogénétique, trois concentrations des extraits de feuilles et écorces des racines ont été préparés, à savoir 250, 500 et 1000 mg de l'extrait sec dans 10 ml d'une solution du carboxy methylcellulose (CMC) à 0.8% à l'aide d'un sonicateur et conservé à 4°C (Figure 14).



Figure 14 : Etapes de la solubilisation des extraits éthanoliques (original).

II.2.3- EVALUATION DE LA GENOTOXICITEE DES EXTRAITS DES FEUILLES ET DES ECORCES DES RACINES DE *P.LENTISCUS***II.2.3.1- ADMINISTRATION DES EXTRAITS ETHANOLIQUES**

L'étude génotoxique a été effectuée, selon le protocole établi par **Preston et ses collaborateurs (1987)**. Les souris ont été divisées en 6 groupes. Chaque groupe a été réparti en deux lots de six souris males et six souris femelles. Les différents traitements réalisés sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau IV : Tableau récapitulatif des différents traitements réalisés sur les souris.

Groupes	Administration orale	Injection intra-péritonéale
Groupe 1 (témoin négatif)	CMC (0.8 %).	Eau distillé stérile
Groupe 2 (témoin positif)	CMC (0.8 %)	CP (50mg/kg).
Groupe 3 (génotoxicité I)	250 mg/kg des extraits éthanoliques des feuilles ou écorce des racines de <i>P. lentiscus</i> .	Eau distillé stérile
Groupe 4 (génotoxicité II)	500mg/kg des extraits éthanoliques des feuilles ou écorce des racines de <i>P. lentiscus</i>	Eau distillé stérile
Groupe 5 (génotoxicité III)	1000mg/kg des extraits éthanoliques des feuilles ou écorce des racines de <i>P. lentiscus</i>	Eau distillé stérile
Groupe 6 (anti génotoxicité)	250 mg/kg des extraits éthanoliques des feuilles ou écorce des racines de <i>P. lentiscus</i>	CP (50 mg/kg).

Les souris ont été gavées avec les différentes concentrations des extraits ethanologiques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, pendant 7 jours consécutifs. Au dernier jour, les souris ont reçu par voie intrapéritonéale le cyclophosphamide (50mg/kg), pour les groupes temoins positifs et antigenotoxiques, tandis que les autres groupes de souris, l'injection est faite à l'aide de l'eau distillée stérile (Figure15).



Figure 15 : Photographie originale de gavage d'une souris.

II.2.3.2- SACRIFICE ET EXTRACTION DE LA MOELLE OSSEUSE

Au huitième jour, et à 24 heures après l'injection du CP, les souris ont été injectées par une solution de colchicine (4mg/kg), par voie intrapéritonéale et les souris ont été sacrifiées, par dislocation cervicale, après 1 h 30 (Figure16).



Figure 16 : Photographies originales d'une injection IP et d'une dislocation cervicale.

Par la suite, les deux fémurs ont été prélevés, et la moelle osseuse a été extraite et mise dans un tube contenant 8ml de KCl (0.56%), à 37°C. Les tubes ont été incubés durant 30 min, puis centrifugés pendant 10min, à 1400 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été

suspendu une deuxième fois dans 5ml du fixateur de Cornoy (Methanol, acide acetique, 3 :1) et conservés à 4°C (Figure17).

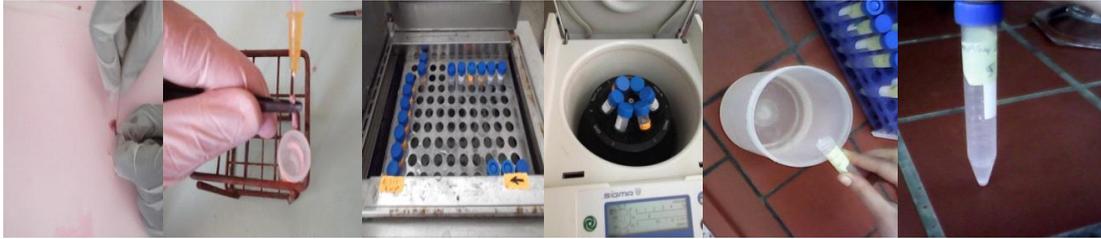


Figure17 : Photographies originales des étapes d'extraction du fémur.

II.2.3.3- FIXATION ET COLORATION DES LAMES

Au neuvième jour, les tubes ont été centrifugés deux fois, avec renouvellement du fixateur. Le culot est alors, étalé sur des lames propres et étiquetées. Après deux heures de séchage, ces dernières ont été colorées avec le GIEMSA (10%), pendant 20 min, puis elles ont été rincées avec de l'eau distillée, afin d'éliminer l'excédent de colorant (Figure 18).



Figure 18 : Coloration des lames (original).

Le lendemain, le montage des lamelles a été effectué, en utilisant l'Eurokitt et du xylène (Figure 19).

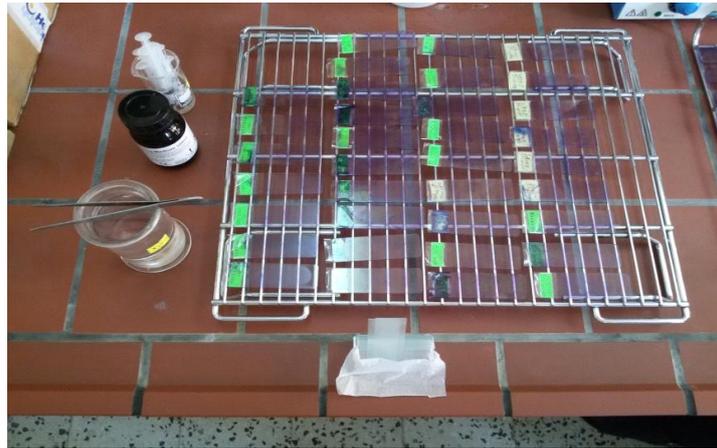


Figure 19 : Montage des lames et les lamelles (original).

II.2.3.4- EXAMEN MICROSCOPIQUE

Une fois que les lames ont été apprêtées, les observations microscopiques des cellules en métaphases ont été effectuées. En effet, pour chaque souris 50 à 100 métaphases bien étalées ont été dénombrées et observées au grossissement X40, avec le total des cellules en interphase et à différents stades de division cellulaire, sur le même champ de vision (Figure 20). Pour chaque métaphase, l'observation est passée au grossissement X100, en utilisant l'huile à immersion, afin de révéler les aberrations, de type fragment, gap, cassure, pulvérisation, association cenromerique, anneau et polyploïdie, s'il ya lieu.

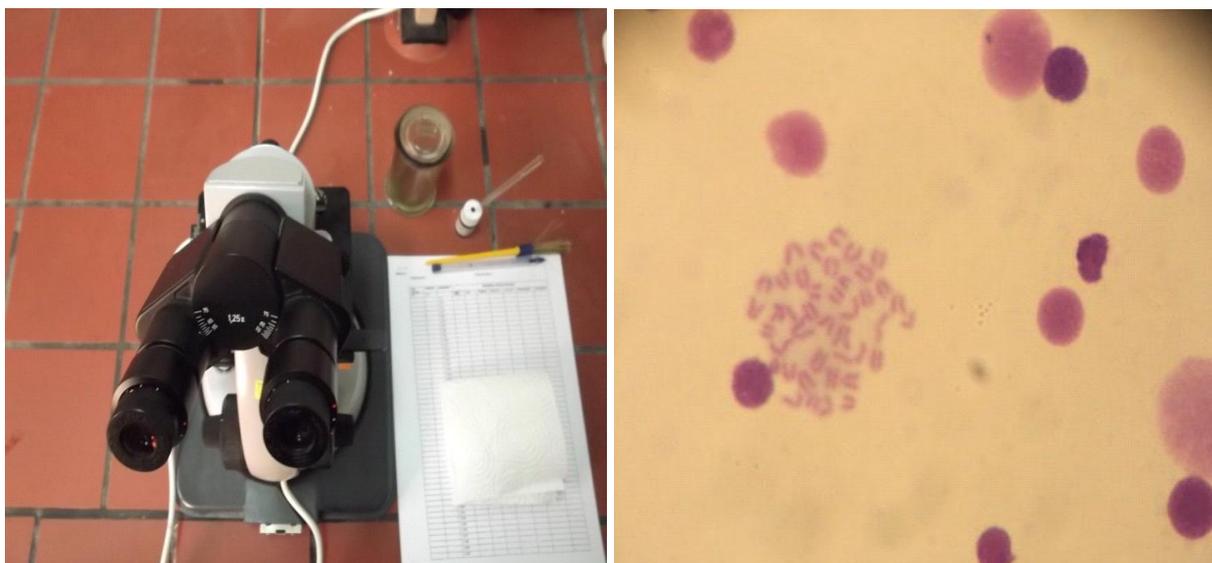


Figure 20 : Microscope optique et la métaphase spread observée au G X 40 accompagné des cellules en interphase (rose foncé, petite) et cellules en divisions (rose clair, grosse) (Original).

Les paramètres d'études microscopiques sont les suivantes :

L'indice mitotique (IM) ; ce paramètre a été utilisé pour chaque lot, afin d'évaluer la cytotoxicité du produit .Il se définit comme le nombre de cellules en division sur le nombre total des cellules dénombrées selon la formule suivante :

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

Le pourcentage des cellules aberrantes (PA) est le rapport entre le nombre de cellules aberrantes, en excluant les lacunes chromatidiques (gap) sur le nombre total des métaphases dénombrées représenté dans cette formule :

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

Par la suite, les résultats ont été obtenus et notés dans des fiches. Un nombre de métaphases dispersées et bien étalées dite « Spread » variant entre 50 et 100 a été fixé pour la validité de ces paramètres.

II.2.4- ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne (S.E.M). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.03, par l'analyse de la variance (ANOVA), suivi du test de Dunnett et Tukey. Les valeurs à partir de $P < 0,05$ sont considérées significatives.

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

III- RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- RESULTATS ET INTERPRETATION

III.1.1- INDUCTION DE LA GENOTOXICITE PAR LE MUTAGENE

III.1.1.1- INDICES MITOTIQUES

Les pourcentages des indices mitotiques des lots de souris traitées avec du CMC (0.8%) représentant les témoins négatifs (C-) et du CP (50mg/kg) représentant les témoins positifs (C+) chez les mâles (M) et femelles (F) sont illustrés dans la figure 21.

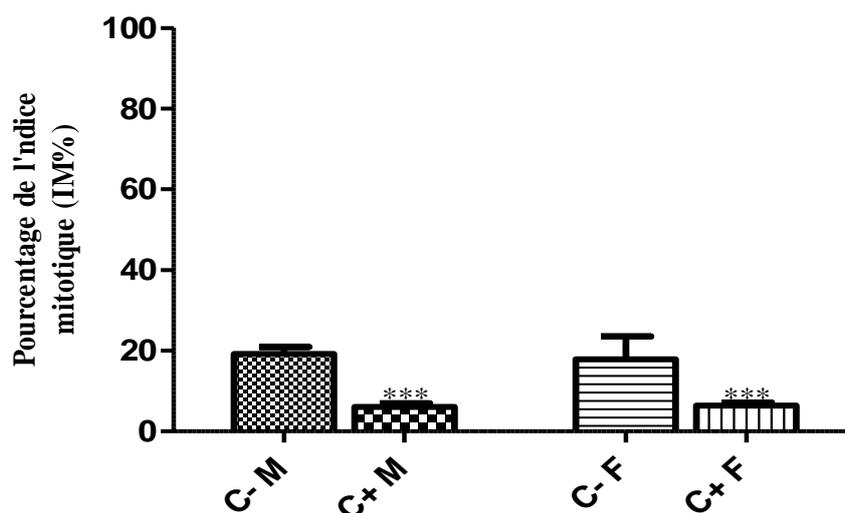


Figure 21 : Histogramme comparatif des pourcentages d'indice mitotique des témoins négatifs (CMC 0.8%) et positifs (CP 50 mg/kg) exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et au (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Tukey.

Le résultat obtenu par le test de Tukey, n'a montré aucune différence significative entre les mâles et les femelles des groupes des témoins négatifs (19%; 18%) et positifs (6%; 6%), par ailleurs, une différence très hautement significative a été observée entre les groupes traités par le CMC et le CP (***) $p < 0,001$).

III.1.1.2- POURCENTAGES DE CELLULES ABERRANTES

Les pourcentages de cellules aberrantes des lots de souris traitées avec du CMC (0.8%) représentant les témoins négatifs et du CP (50mg/kg) représentant les témoins positifs sont illustrés dans la figure 22.

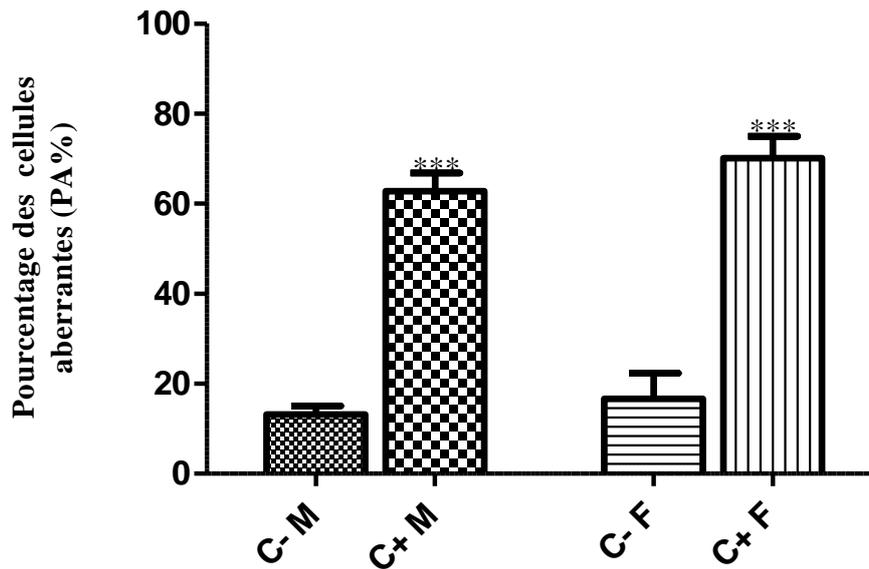


Figure22 : Histogramme comparatif des pourcentages des cellules aberrants des témoins négative (CMC 0.8%) et témoin positif (CP 50 mg/kg) exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$ comparé au C- et au (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Tukey.

Les pourcentages des cellules aberrantes des témoins positifs (63% ; 70%) comparativement à ceux des témoins négatifs (13% ; 17%) sont très hautement significatifs (***) $P < 0.001$, en outre les pourcentages des males et femelles du même contrôle ne montrent aucune différence significative.

III.1.1.3- TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Les différents types et fréquences des aberrations chromosomiques observées chez les témoins négatifs et positifs sont illustrées dans le tableau V.

Tableau V : Différents types et fréquences des aberrations chromosomiques chez les deux témoins négatif et positif.

Lots	Sexe	Métaphase	Différentes aberrations chromosomiques							PA%	
			Gap	Anneau	Fragment	Del. chrom	Ass. cent	Pulvérisation	Polyplôidie	∑ + Gap	∑ - 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	6	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
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

Les résultats de ce tableau nous informent tout d'abord sur une faiblesse des pourcentages d'aberrations chromosomiques des groupes témoins négatifs avec une moyenne 13% comparé au groupes de témoins positifs d'une moyenne de 62%. Nous remarquons également une fréquence considérable des fragments comparé aux autres aberrations et qui est plus marquée dans les témoins positifs. Les délétions chromosomiques et pulvérisations sont plus accentuées chez les femelles des groupes positifs. Les aberrations de types polyplôidies et associations centromériques sont très faibles ; par contre celles de type de Gap et anneau sont moyennement observées.

III.1.2- EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES FEUILLES DE *P.LENTISCUS*

III.1.2.1- INDICES MITOTIQUES

Les résultats des pourcentages des indices mitotiques des lots de souris traitées par les différentes doses d'extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* (PF) sont représentés dans l'histogramme de la figure 23.

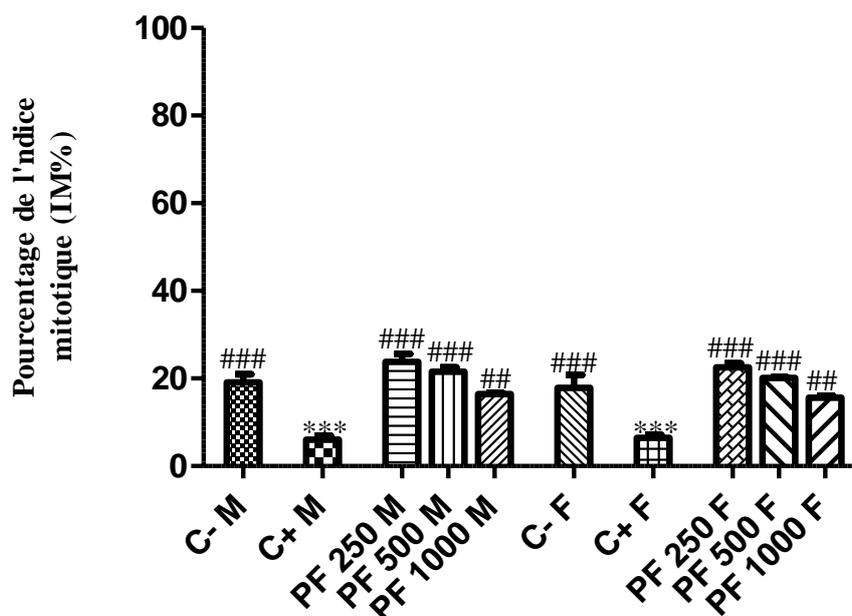


Figure 23 : Histogramme représentatif des pourcentages des indices mitotiques des extraits des feuilles de *P.lentiscus* de 250, 500,1000mg/kg chez les mâles et femelles exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Dunnett.

Les résultats des pourcentages des indices mitotiques des différents extraits de 250 (23% ; 23%), 500 (22%; 20%) et 1000mg/kg (16%; 16%), des feuilles de *P.lentiscus* ne sont pas significatifs vis-à-vis du témoin négatif (19%; 18%), mais très hautement significatif vis-à-vis du témoin positif (6%; 6%) (### $P < 0.001$) pour les groupes 250,500mg/kg et hautement significatif pour les doses de 1000mg/kg (## $P < 0.005$).

III.1.2.2- POURCENTAGES DES CELLULES ABERRANTES

Les pourcentages des cellules aberrantes obtenus par les différentes doses des extraits des feuilles de *P.lentiscus* sont représentés dans la figure 24.

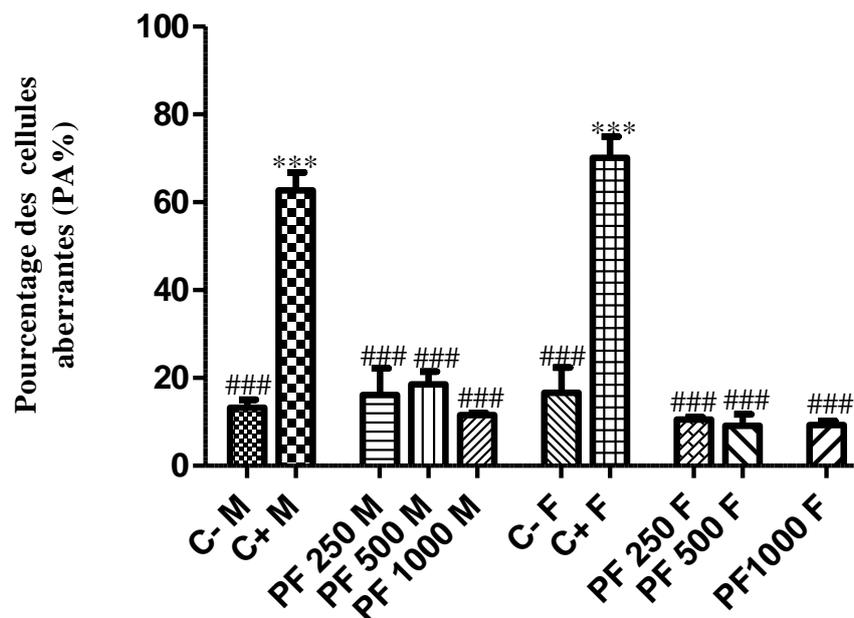


Figure 24 : Histogramme représentatif des pourcentages des cellules aberrantes des extraits des feuilles de *P.lentiscus* de 250, 500,1000mg/kg chez les males et femelles exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Dunnett.

Les résultats obtenus lors de cette étude statistique démontrent que les pourcentages des cellules aberrantes des différentes doses de 250 (16%; 11%), 500 (19%; 9%) et 1000mg/kg (12%; 9) des feuilles de *P.lentiscus* ne présentent pas de différences significatives vis-à-vis des témoins négatifs (13%; 17%) , par contre ils montrent une différence très hautement significative par rapport au témoin positif (63%; 70%) (### $P < 0.001$).

III.1.2.3- TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Les résultats des différents types et fréquences des aberrations chromosomiques induites par les doses de *P.lentiscus* sont représentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Différents types et fréquences des aberrations chromosomiques provoquée par les feuilles de *P.lentiscus*.

Dose mg/kg	Sexe	Met. spread	Différentes aberrations chromosomiques							PA %	
			Gap	Anneau	Fragment	Del. chrom	Ass. cent	Pulvérisation	Polyplôidie	Σ + Gap	Σ - Gap
250	♀	50	5	1	2	1	1	0	1	11	6
		50	3	1	3	1	1	0	0	19	8
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♂	54	1	1	5	0	2	0	4	24	22
		50	8	1	3	1	1	0	0	22	10
		-	-	-	-	-	0	0	0	-	-
500	♀	100	7	3	5	4	1	0	1	19	8
		92	2	2	3	1	0	0	0	8	7
		50	4	1	1	2	1	0	2	22	14
	♂	100	3	0	8	2	2	0	1	16	14
		68	2	1	9	2	2	0	1	23	21
		50	0	1	10	1	2	0	2	34	34
1000	♀	56	4	3	4	5	3	0	1	14	10
		62	2	1	2	2	0	0	0	12	8
		91	3	2	2	1	1	0	0	15	10
	♂	100	2	2	2	2	0	0	2	17	11
		50	6	3	4	2	2	0	0	16	12
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A première vue, de faibles pourcentages d'aberration chromosomique sont à noter avec une moyenne tournant au tour de 20%. Les fréquences des différentes aberrations sont également minimales.

III.1.3- EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES ECORCES DES RACINES DE *P.LENTISCUS*

III.1.3.1- INDICES MITOTIQUES

Les pourcentages des indices mitotiques des souris traitées par différentes doses des extraits des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* (PER) sont représentés dans la figure 25.

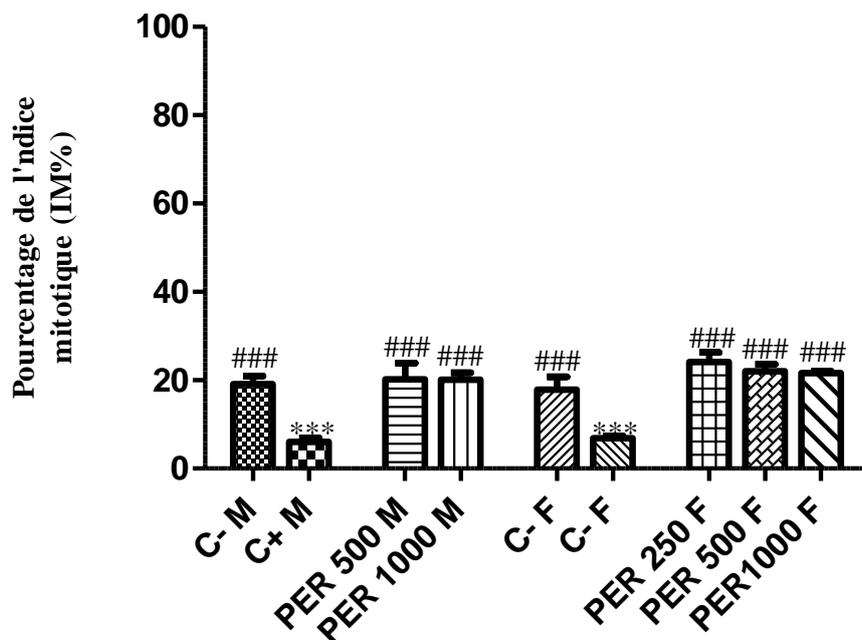


Figure 25 : Histogramme représentatif des pourcentages des indices mitotiques des extraits des écorces des racines de *P.lentiscus* de 250, 500,1000mg/kg exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Dunnett .

Les résultats des indices mitotiques des écorces des racines de *P.lentiscus* des doses 250 (24%); 500 (20%; 22%); 1000 mg/kg (20%; 22%) représentés dans cet histogramme montrent des différences très hautement significatives par rapport au témoin positif (6%; 6%) (### $P < 0.001$) et non significatives en les comparant au témoin négatif (19%; 18%).

III.1.3.2- POURCENTAGES DES CELLULES ABERRANTES

Les résultats des pourcentages des cellules aberrantes des lots de souris traitées par les différentes doses des extraits des écorces des racines de *P.lentiscus* sont représentés dans l'histogramme de la figure 26.

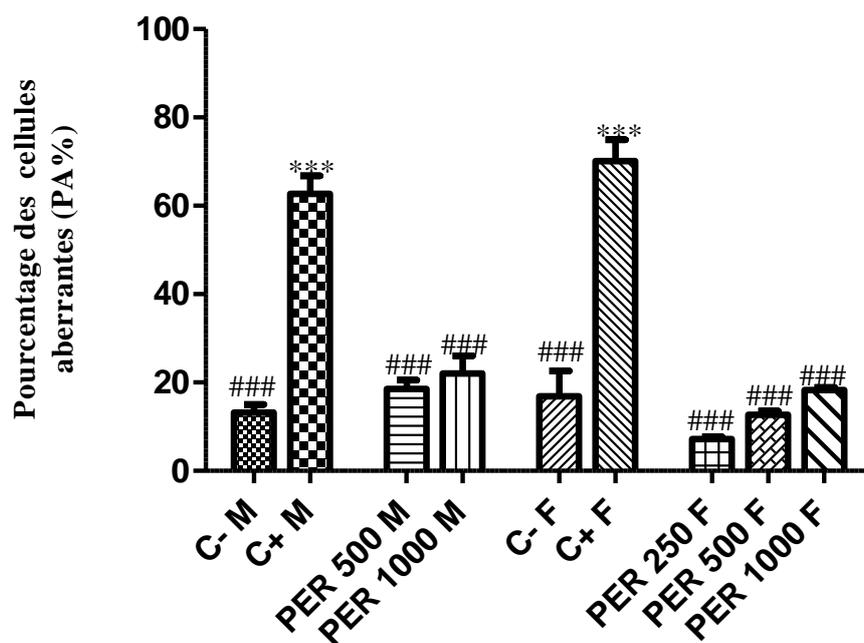


Figure 26 : Représentation graphique des pourcentages des indices mitotiques des extraits des écorces des racines de *P.lentiscus* de 250, 500,1000mg/kg exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Dunnett .

Le résultat des pourcentages des cellules aberrantes obtenues par les différentes concentrations des écorces des racines de *P.lentiscus* à savoir 250 (7%); 500 (19%; 13%); 1000 mg/kg (22%; 18%) a montré une différence non significative face au témoin négatif (13%; 17%) mais très hautement significative face au témoin positif (63%; 70%) (### $P < 0.001$).

III.1.3.3 TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Les résultats des observations microscopiques de différents types et fréquences des aberrations chromosomiques induites par l'écorce des racines de *P.lentiscus* sont illustrés dans le tableau VII.

Tableau VII : Différents types et fréquences d'aberrations chromosomiques provoquées par les extraits des écorces des racines *P.lentiscus*.

Dose mg/kg	Sexe	Met .spread	Différentes aberrations chromosomiques							PA %	
			Gap	anneau	Fragment	Del .chrom	Ass . cent	Pulvérisation	Polyploïdie	∑ + Gap	∑ - Gap
250	♀	100	5	2	2	2	1	0	0	13	8
		100	4	3	5	3	2	0	0	10	9
		100	4	2	7	4	0	0	0	12	8
		50	3	1	2	1	1	0	0	12	6
	♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
500	♀	100	4	0	5	4	2	0	0	15	11
		100	4	2	3	3	0	0	0	17	12
		100	3	3	4	5	1	0	0	16	13
	♂	50	2	0	7	9	2	0	0	16	14
		50	4	2	10	2	5	0	2	23	21
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	♀	100	5	3	6	2	1	0	1	14	10
		100	5	2	10	4	2	0	0	12	8
		100	4	0	5	3	3	0	0	15	10
	♂	50	8	2	14	1	7	0	2	24	18
		50	10	1	5	0	2	0	0	28	24
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D'après le tableau ci-dessus de faibles pourcentages d'aberrations chromosomiques et des différentes aberrations sont remarquées comme précédemment.

III.1.4- EVALUATION DE L'EFFET COMBINE DU MUTAGENE ET LES DEUX PARTIES DES EXTRAITS DE *P.LENTISCUS*

III.1.4.1- POURCENTAGES DES INDICES MITOTIQUES

Le résultat des pourcentages des indices mitotiques des souris traitées par les extraits des feuilles (AGPF) et les écorces des racines (AGPER) de *Pistacia lentiscus* combiné au mutagène sont représentés dans l'histogramme 27.

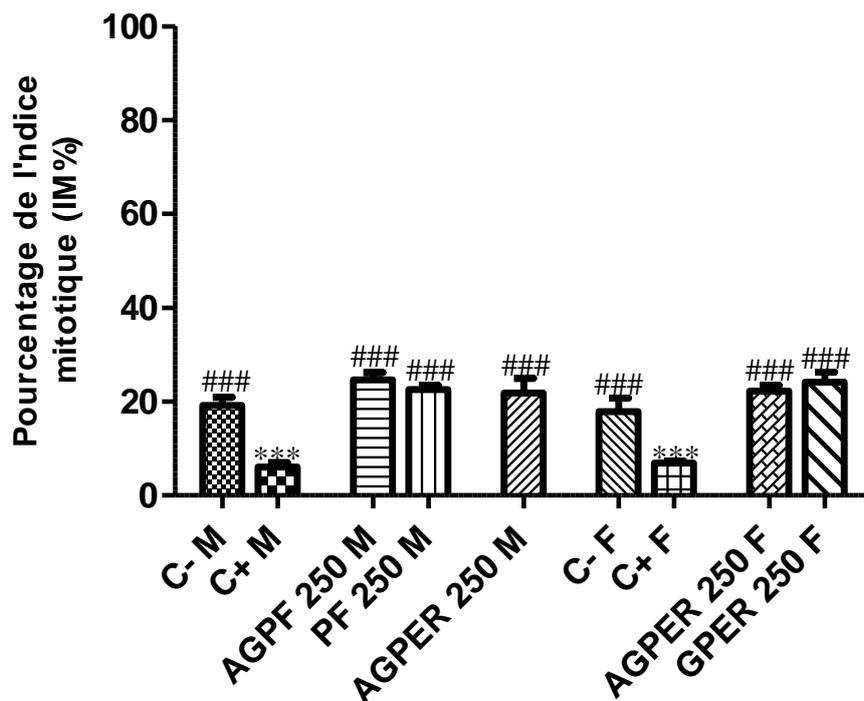


Figure 27 : Représentation graphique des pourcentages des indices mitotiques des extraits des feuilles et les écorces des racines de *P.lentiscus* de 250mg/kg combiné à l'agent mutagène sont exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Dunnett .

Le pourcentage des indices mitotiques des extraits de feuilles (25%) et des écorces des racines (22%; 22%) de *P.lentiscus* à une dose de 250 mg/kg combiné au mutagène ne présentent pas de différences significatives vis-à-vis du témoin négatif (19%; 18%), par contre ils montrent une différence très hautement significative par rapport au témoin positif (6%; 6%) (### $P < 0.001$).

III.1.4.2- POURCENTAGES DES CELLULES ABERRANTES

Les pourcentages des cellules aberrantes des souris traitées par les extraits des feuilles et les écorces des racines de *Pistacia lentiscus* combiné au mutagène sont représentés dans la figure 28.

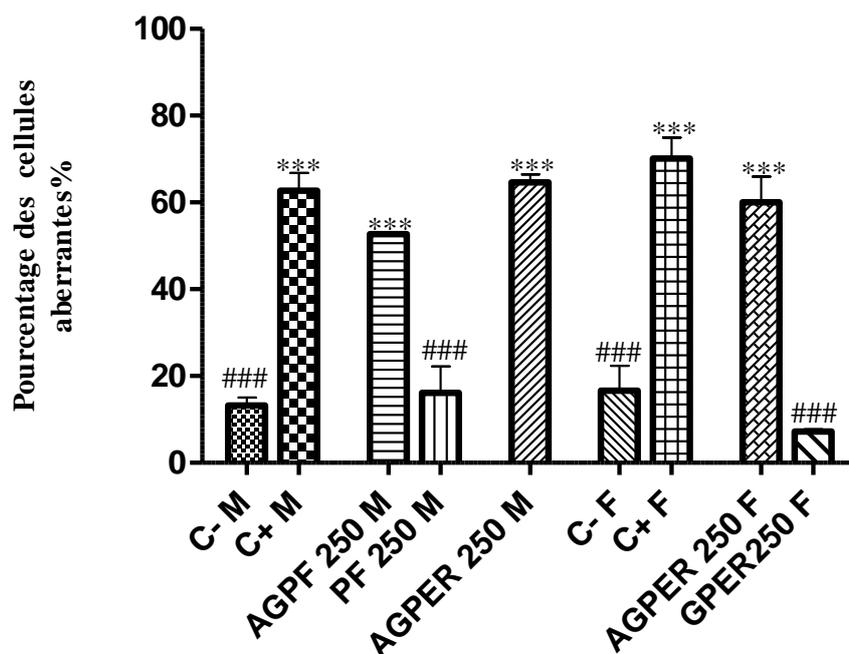


Figure 28 : Représentation graphique des pourcentages des cellules aberrantes des extraits des feuilles et écorces des racines de *P.lentiscus* de 250mg/kg combiné au mutagène qui sont exprimés en moyenne \pm SEM, (***) $P < 0.001$) comparé au C- et (### $P < 0.001$) au C+ via le logiciel de GraphPad prism5 par le test de Dunnett .

Les pourcentages des cellules aberrantes chez les souris traitées avec des extraits des feuilles (53%) et des écorces des racines (64%; 60%) de *P.lentiscus*, à 250mg/kg, en association avec l'agent mutagène, sont nettement supérieurs (***) $P < 0.001$), par rapport aux témoins négatifs (13%; 17%) , et ne présentent aucune différence significative aux taux des aberrations révélées, par les souris qui ont reçu uniquement le cyclophosphamide (63%; 70%). De ce fait, les extraits des deux parties de la plante n'ont pas pu réduire le taux des aberrations provoquées par le cyclophosphamide.

III.1.4.3- TYPES ET FREQUENCES DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Les différents types et fréquences des aberrations chromosomiques induites par les feuilles et les écorces des racines de *P.lentiscus* combiné au mutagène sont illustrés dans le tableau VII.

Tableau VIII: Différents types et fréquences d'aberrations chromosomiques observées chez les groupes anti génotoxiques des feuilles et des écorces des racines de *P.lentiscus*.

Lots et Doses (mg/kg)	Sexe	Met. spread	Différentes aberrations chromosomiques							PA%	
			lacune	anneau	Fragment	Del.chrom	Ass .cent	Pulvérisation	Polyploïdie	∑ + Gap	∑ - Gap
AG PF 250	♀	50	0	0	17	0	1	17	0	48	48
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♂	100	4	3	45	7	1	46	0	55	52
		100	4	5	40	12	0	43	0	54	53
		100	3	1	27	2	0	39	0	55	53
AG PER 250	♀	89	13	4	34	8	1	30	1	51	49
		71	10	5	58	3	0	30	0	62	60
		100	5	5	156	4	2	44	0	70	70
	♂	50	1	6	23	1	0	24	0	70	68
		50	2	0	25	0	0	25	0	68	64
		50	0	2	8	0	0	18	0	62	62

En référence au tableau ci-dessus une large augmentation du taux des aberrations chromosomiques est observée. Une hausse du nombre des aberrations de types fragment et pulvérisation qui sont sûrement dus au mutagène. Par contre les nombres des autres aberrations restent toujours dans la même gamme que les groupes traités avec les extraits seuls.

Les différentes aberrations chromosomiques observées au grossissement G X 100 dans les groupes traités par le mutagène combiné aux extraits des feuilles et des écorces des racines sont représentés dans la figure 29.

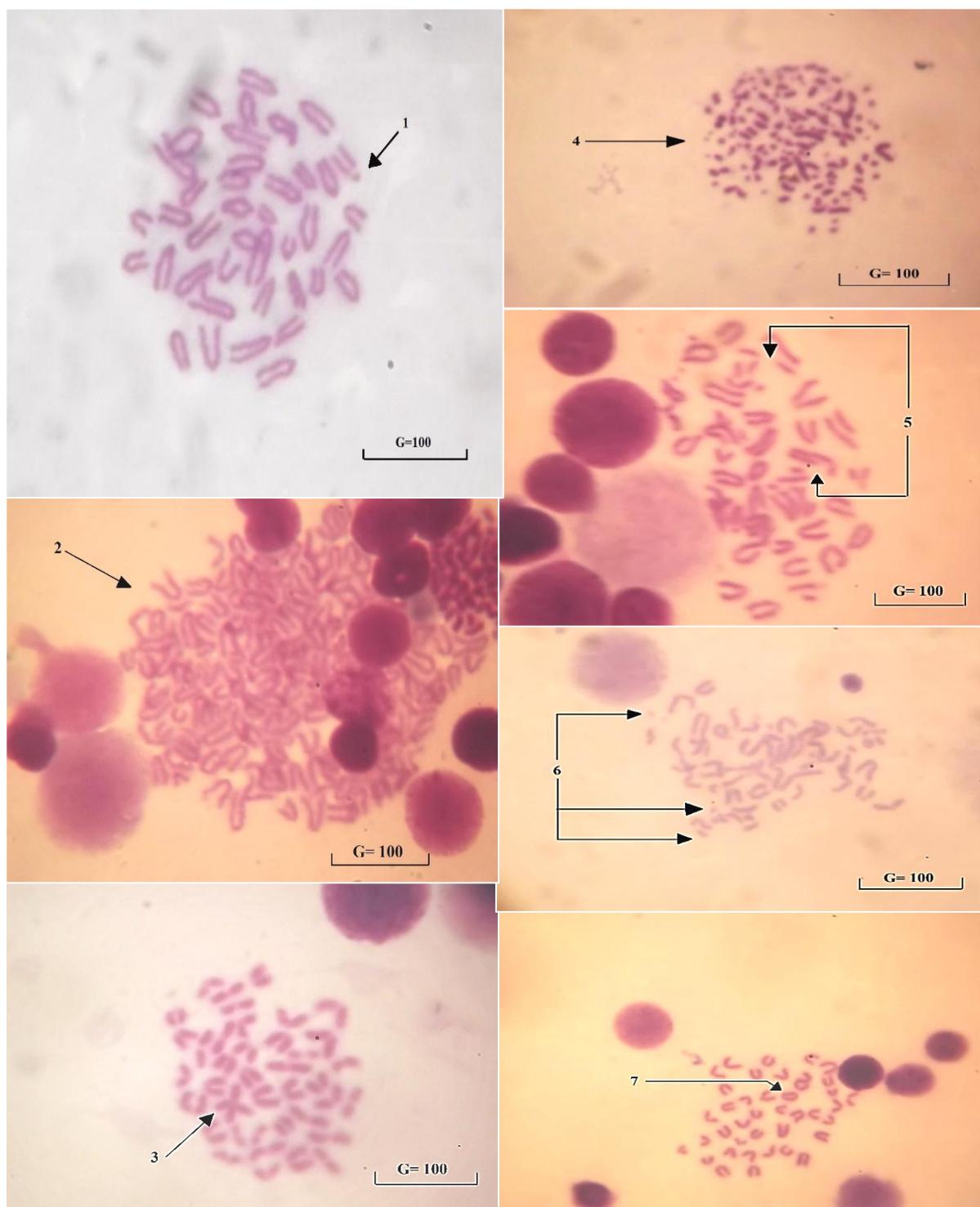


Figure 29 : Photographies originales des différentes aberrations chromosomiques. 1: Gap, 2: polyplöidie, 3: Association centromérique , 4: Pulvérisation, 5: Délétion chromosomique, 6: fragment, 7: Anneau.

III.2- DISCUSSION DES RESULTATS

La visée principale de cette étude est d'évaluer l'activité génotoxique et anti génotoxique, par le test des aberrations chromosomiques, des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*.

Cette dernière est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter l'ulcère, les douleurs du haut de l'abdomen et l'hypertension. En plus, plusieurs activités biologiques intéressantes lui ont été retrouvées, notamment antioxydante, anti inflammatoire et anti-tumoral (**Abdelwahed et al., 2006; Remila et al., 2015**).

Ces activités ont été attribuées principalement, aux métabolites secondaires de ses feuilles majoritairement constitués de flavonoïdes à l'instar de la quercétine et de la catéchine, d'acides phénoliques représentés par l'acide gallique et ses dérivés galloyls et des anthocyanes, à savoir la delphinidine (**Abdelwahed et al., 2006; Hertzog et Tica, 2012; Taylor et al., 2014; Farhan et al., 2016**).

Cependant Aucun article n'a rapporté l'étude phytochimique des écorces des racines de *P.lentiscus*. L'extraction par l'éthanol avait comme but d'extraire cette gamme de composés phénoliques.

Cette étude de la génotoxicité des extraits des feuilles et des écorces des racines de *P.lentiscus* a été réalisée par la méthode des aberrations chromosomiques. C'est une méthode qui permet de détecter les anomalies chromosomiques, au cours de la mitose par examen microscopique. Elle est sensible vis-à-vis de l'agent mutagène et permet de déterminer par la suite, l'impact génétique de ce dernier sur les cellules de la moelle osseuse de souris. Comparativement aux autres tests, cette méthode permet d'étudier les effets des molécules qui peuvent être métabolisées par l'organisme (**Shelby et Witt, 1995**).

L'indice mitotique a été considéré par plusieurs auteurs comme le premier paramètre indicatif de la cytotoxicité. Sa variation est proportionnelle aux perturbations subies par les cellules. Il fournit les informations nécessaires sur le pourcentage de cellules en division, comparées à l'ensemble des cellules à différents stades du cycle cellulaire (**Mehnaz et al., 2010; Amer et Satheesh, 2014**).

En outre, les résultats des pourcentages des indices mitotiques obtenus avec les témoins négatifs femelles (18%) et males (19%) ont été comparables, à ceux rapportés par **Mehnaz et ses collaborateurs (2010)**.

Le CP est un agent alkylant, bi fonctionnel et anti néoplasique, activé après métabolisation par les hépatocytes. Sa toxicité est due à ses dérivés métaboliques (moutarde phosphoramide et acroléine), approuvés par plusieurs auteurs (**Diana et al., 1995; Milly et al., 2005; Ashkan et al., 2009**).

La moutarde phosphoramide est la principale responsable de l'effet anti néoplasiques, elle se transforme en ion aziridinium cationique de façon spontanée après libération du chlore. Par conséquent, elle se lie à un groupement nucléophile, qui est l'azote N7 de la guanine qui deviendra par la suite chargé positivement et sera hydrolysé spontanément pour donner un site abasique. Cette même réaction se répète pour le second brin d'ADN, ainsi l'accumulation répétitive et rapprochée des sites abasiques dans les deux brins du matériel génétique provoque des fragmentations (**Michael et al., 2003; Ashkan et al., 2009**). Cette dernière est une aberration observée chez toute les souris traitées avec le CP.

L'acroléine, cet aldéhyde insaturé, est formé d'une façon équimolaire avec la moutarde phosphoramide. Il est responsable de la majorité des effets secondaires toxiques. Il possède la capacité de se fixer sur les guanines de l'ADN d'une façon cyclique ou linéaire, les protéines anti-oxydantes enzymatiques et non enzymatiques, notamment la GPX, la SOD et la GSH et de diminuer l'expression de la p53, ce qui augmente le stress oxydatif. L'ensemble des effets combinés de l'acroléine provoque l'accumulation des mutations géniques et chromosomiques (**Jan et Claudia, 2008**).

Le CP a diminué d'une manière conséquente l'IM, se traduisant par une division cellulaire tardive (6%), qui sont comparables au résultat de **Mehnaz et ses collaborateurs, (2010)**. Cette diminution d'IM s'est accompagnée d'une augmentation du taux des aberrations chromosomiques (62% et 70% pour les deux témoins positifs males et femelles), un résultat comparable à ceux obtenus par **Amer et Satheesh, (2014)**.

Une légère différence de l'IM a été observée chez les groupes traités avec les concentrations 1000 mg/kg, des feuilles de *Pistacia lentiscus* comparativement aux groupes des contrôles positifs ($^{##}P < 0.005$), ce qui nous laisse suggérer que cet extrait peut inclure des métabolites ayant interagit avec les biomolécules cellulaires.

Parmi ces métabolites secondaires actifs présents dans cette plante, la quercétine, qui est un flavonol très reconnue pour son pouvoir anti-oxydant à des faibles doses, qui se traduit par le piégeage des ERO, la chélation des métaux toxiques dans l'organisme, ainsi qu'à l'expression des protéines antioxydantes, via le NRF2 (**González *et al.*, 2007**).

À de fortes concentrations, elle devient un pro-oxydant, car elle se fixe de façon spontanée, à la GSH ou bien aux autres protéines. Suite à cela, elle forme des ERO par l'intermédiaire de son noyau B et enfin elle inhibe l'activité de la thymidilate synthétase et de l'ADN polymérase (**Hertzog et Tica, 2012**).

D'autre part, la catéchine (flavanol) est un anti oxydant à potentiel élevé, agit soit d'une façon directe, en réduisant les ERO, ou bien d'une façon indirecte, par l'inhibition de la libération du NF-kB au noyau (**González *et al.*, 2007**).

La delphinidine, de son côté, est un anthocyane, qui possède une activité anti oxydante indirecte, via le NRF2. A l'état oxydé, elle se fixe sur la GSH et inhibe l'activité de la GST (**Taylor *et al.*, 2014**).

Par ailleurs, l'acide gallique et ses dérivés galloyls font parties des acides phénoliques. Ils possèdent une activité antioxydante directe, mais leur particularité est qu'ils ciblent les électrophiles et ne les laissent pas diffuser dans le cytosol, à travers les canaux physiologiques (**Hour *et al.*, 1999**).

Les résultats des indices mitotiques des extraits des feuilles et des écorces des racines à des doses de 250mg/kg combinées au mutagène ont montré qu'il n'y a aucune différence significative avec les témoins négatifs. Par contre ils ont montré une différence significative par rapport au témoin positif ($^{###}P < 0.001$). Cela suggère que les composés phénoliques présents dans ces deux parties de la plante agissent d'une façon coopérative vis-à-vis de l'acroléine et les ERO au niveau cytosolique afin de réduire des ERO, ainsi que les protéines antioxydantes, d'éliminer les molécules électrophiles et d'entraîner enfin le captage des métaux.

Par contre, les effets de ces extraits sur les pourcentages d'aberrations chromosomiques ne présentent pas de différences significatives, vis-à-vis des témoins positifs. Cela indique que les extraits n'ont pas protégé le matériel génétique des attaques des différents métabolites du cyclophosphamide.

CONCLUSION

CONCLUSION

La cible principale de notre investigation porte sur l'évaluation des effets protecteurs des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* sur la génotoxicité, induite par le cyclophosphamide, sur les cellules de la moelle osseuse de souris et de ses éventuels effets génotoxiques. Cette investigation a été réalisée par le test des aberrations chromosomiques.

Le traitement avec le cyclophosphamide (50mg/kg) induit une génotoxicité et une cytotoxicité accrue, avec une différence significative en comparaison avec le contrôle négatif. Les types d'aberrations chromosomiques fréquemment provoqués, sont les lacunes (gap), fragments et les délétions chromosomiques.

Le traitement avec les concentrations 250, 500 et 1000 mg/kg des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *P.lentiscus* n'a aucun effet génotoxique, ni cytotoxique en comparaison avec les témoins positifs et négatifs. Les fréquences des aberrations chromosomiques sont très faibles.

Par ailleurs, les traitements antigénotoxiques des concentrations de 250mg/kg des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, en présence du cyclophosphamide ont exhibé un effet cytoprotecteur contre l'action de ce dernier et non génoprotecteur. En effet, les pourcentages d'aberrations chromosomiques sont restés inchangés, comparés aux groupes de contrôle positif, par contre les indices mitotiques n'ont montré aucune différence significative, par rapport aux groupes du contrôle négatif. Les aberrations chromosomiques remarquablement observées sont les pulvérisations et les fragments.

Ces effets cytoprotecteurs seraient principalement dus à ses composés polyphénoliques, notamment quercétine, delphinidine, catéchine, acide gallique et dérivées galloyls, connus surtout pour leur forte activité antioxydante.

En perspective, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cet effet avec d'autres doses ; ainsi que par d'autres tests, reprendre le test avec plus d'effectifs à observer et un nombre d'observateurs diversifiés ; déterminer les doses efficaces minimales ; s'assurer de la reproductibilité des résultats ; élucider les mécanismes moléculaires exacts de ces métabolites, ainsi que leurs activités prises séparément.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Rahman, A. et Soad, A. (1975). Mastic as antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52: 423.
- Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P. et Dijoux-Franca, M. G. (2006). 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.
- Aik, J. et Chang, T. K. (2009). Inhibition of human CYP2B6-catalyzed bupropion hydroxylation by Ginkgo biloba extract: effect of terpene trilactones and flavonols. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(9): 1931-1937.
- Amer, J. et Satheesh, S. (2014). In Vivo Evaluation of Genotoxic Effects of *Euphorbia Nivulia* Buch on Mice Bone Marrow Cells Using Chromosomal Aberration Test and Micro Nucleus Assay. *International Journal of Pharma Research & Review*, 3(1): 28-33.
- Anonyme. (2009). *Traitements des cancers*. Paris: Corvisart. p 5-20.
- Anu, C. (2010). *Pharmaceutical chemistry*. Shivaji road: KHISHNA PRAKASHAN. p 125.
- Ashkan, E., Jones, R.J. et Brodsky, R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Review*, 6: 638-647.
- Atmani, D., Ruiz-Larrea, M. B., Ruiz-Sanz, J. I., Lizcano, L. J., Bakkali, F. et Atmani, D. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4): 589-598.
- Baratto, M. C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F. et Pogni, R. (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *Pistacia lentiscus* leaves. *Free Radical Research*, 37(4): 405-412.
- Baudisson, S., Belaid, K., Huyghues, E., Pasini, M. et Provost, F. (2006). *Les thérapies anti-cancéreuses ciblées*. Université Nice SOPHIA ANTIPOLIS (Département Génie Biologique): Revue de la littérature. p 294-307.

- Belhadj, S. (2001). Geographical distribution of *Pistacia atlantica* Desf in :Algeria. *acta horticulturae*, 591 (1): 499-503.
- Bhourri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, M. et Chekir-Ghedira, L. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*, 24(2): 509-515.
- Biyi, A., Benrais, N. et Benomar, S. (1998) . Mécanisme de la carcinogénèse à la lumière des données de la biologie moléculaire .*Médecine du Maghreb*, 69 :14-18.
- Boullard, B. (1997). *Dictionnaire: plantes & champignons*. Île-de-France: Editions scientifiques, techniques et médicales. p 637.
- Castola, V., Bighelli, A. et Casanova, J. (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(1): 79-88.
- Charles, R., Judith, M., Rachel, F. et Adam, F. (2011) . The Effects of Acrolein on the Thioredoxin System: Implicationsfor Redox-Sensitive Signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(9): 1361-1374.
- Chauveragne, J. et Hoerni, B.(2001). *Chimiothérapie anticancéreuse*. Paris: Masson .p5.
- Couto, A. G., Kassuya, C. A., Calixto, J. B. et Petrovick, P. R. (2013). Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), 124-131.
- Danqi, C., Lei, F., Hongjie, L., Moon-shong, T. et Chunyuan, J.(2013). Cigarette Smoke Component Acrolein Modulates Chromatin Assembly by Inhibiting Histone Acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30): 21678-21687.
- Dedoussis, G. V., Kaliora, A. C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N. G. et Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174(2): 293-303.

De-Oliveira, A. C., Ribeiro-Pinto, L. et Paumgarten, F. J. (1997). In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicology letters*, 92(1): 39-46.

Diana, A., Jack, B. et Paul, B. (1995). Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity of potential germ cell risk. *Mutation Research*, 330:115-181.

Farhan, M., Khan, H. Y., Oves, M., Al-Harrasi, A., Rehmani, N., Arif, H. et Ahmad, A. (2016). Cancer Therapy by Catechins Involves Redox Cycling of Copper Ions and Generation of Reactive Oxygenspecies. *Toxins*, 8(2) : 37.

Fasinu, P. S., Bouic, P. J. et Rosenkranz, B. (2012). An overview of the evidence and mechanisms of herb–drug interactions. *Frontiers in Pharmacology*, 3: 69.

Feng, Z., Hu, Y. et Tang, M. (2006). Acrolein is a major cigarette -related lung cancer agent: preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *National Academy of Sciences*, 103: 15404-15409.

Georges, C. (1997). *Pharmacologie intégrée* .Bruxelle :De boeck. p 193.

González, S., Sánchez-Campos, Y. et Tuñón, M.J .(2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, 22(3) : 212-1611.

Hertzog , D.I. et Tica, S.(2012). Molecular mechanisms underlying the anti-cancerous action of flavonoids. *Current Health Science Journal*, 38(4): 145-149.

Hisiang, T., Zhang, S., Hu, Y., et Tang, M. (2009). Mutagenicity and Sequence Specificity of Acrolein-DNA Adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 22: 511-517.

Hour. C., Liang, Y., Chu, I. et , Lin, J. (1999) .Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine . *Food and Chemical Toxicology*, 37:569-579.

Hsiang-Tsui, W., Dan, T., Jian, H., Liya, Gu., Xue-Ru, Wu., Fung-Lung, C. et Guo-Min, L. (2012). Effect of Carcinogenic Acrolein on DNA Repair and Mutagenic Susceptibility. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 287(15): 12379-12386.

INRS. (2015). Acroleine , Fiches toxicologiques. *INRS* ,1 :11.

- Irina .G., Kozekov, I.D., Harris, T.M., Rizzo, C.J., Lloyd, R.S. et Stone, M.P. (2009). Chemistry and Biology of DNA Containing 1, N^2 -Deoxyguanosine Adducts of the α,β -Unsaturated Aldehydes Acrolein, Crotonaldehyde, and 4-Hydroxynonenal. *Chemical Research in Toxicology*, 22, 759–778.
- Jan, S. et Claudia, M. (2008). Acrolein: Sources,metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52: 7-25.
- Janakat, S. et Al-Merie, H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacol*, 83 : 135-138.
- Jean François, M., Françoise , M. et Denis, M. (2011).*Thérapeutiques du cancer*. Paris :Springer-Verlag. p 32.
- Jung, H .(2013). Modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the lipid peroxidation product, acrolein. *BMB Reports*, 46(11):555-560.
- Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H. et Duru, M. (2003). Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in turkey. *Fitoterapia*, 74:164-167.
- Larone, D. et delpart, C. (2007).*Chimiothérapie anticancéreuse*. Paris : Masson. p 6.
- Leroy, T. (2006). *Cancérologie* .Paris :Vernazobers-Grego. p13.
- Liu, Z., Chen, Z., Han, F., Kang, X., Gu, H. et Yang, L. (2016). Microwave-assisted method for simultaneous hydrolysis and extraction in obtaining ellagic acid, gallic acid and essential oil from *Eucalyptus globulus* leaves using Brönsted acidic ionic liquid [HO 3 S (CH 2) 4 mim] HSO 4. *Industrial Crops and Products*, 81 (1):152-161.
- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. B. et Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Planta medica*, 65(8): 749-752.
- Mehnaz. M, Giri, S., et Giri, A. (2011). Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vivo. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental*, 721 : 147-152.

Michael, E., Donald, A., Raphael, E., Ralph, R., Weichselbaum, M., Robert, C. et Bast, J. (2003). Cancer medicine. *BD DECKER*, 6 :213.

Milly, J., Huitema, A., Rodenhuis, S. et Beijnen, J. (2005). Clinical pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*, 44: 1135-1164.

More D. et White J. (2005). *Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde*. Paris : Editions Flammarion.p 18-24.

Munsch, N., Recondo, A. et Frayssinet, C. (1973). Effects of acrolein on DNA synthesis *in vitro*. *FEBS Letters* 30: 286-291.

Norbert, S., Nguyen, T.B., Nizkorodov, S.A. et Delfino, R.J. (2012). Glutathione peroxidase inhibitory assay for electrophilic pollutants in diesel exhaust and tobacco smoke. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403:431-441.

Palevitch, D. et Yaniv, Z. (2000). *Medicinal plants of the Holy Land*. Ben Shemen: Modan Publishing House.p 9-88.

Paraschos, S., Magiatis, P., Mitaku, S., Petraki, K., Kaliaropoulos, A., Maragoudakis, P., Mentis, A. et Skaltsouni, S. (2007). In vitro and in vivo activity of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy Journal*, 51: 551-559.

Parker, W. B., Nishizawa, M., Fisher, M. H., Ye, N., Lee, K. H. et Cheng, Y. C. (1989). Characterization of a novel inhibitor of human DNA polymerases: 3, 4, 5-tri-O-galloylquinic acid. *Biochemical pharmacology*, 38(21) : 3759-3765.

Pelli, C. (2005). Prédiposition génétique des cancers :Aspects épidermiologiques. *INSERM*, 4: 304-312.

Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. et Shelby, M. (1987). Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2): 157-165.

Prichard, A. (2004). The use of essential oils to treat snoring. *Phytotherapy Research*, 18: 696-699.

- Rehman, M. U., Tahir, M., Ali, F., Qamar, W., Lateef, A., Khan, R. et Sultana, S. (2012). Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Molecular and cellular biochemistry*, 365(2): 119-127.
- Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T. et Atmani, D. (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.
- Roger, L., Larson, C. et Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale*. Montrouge ;John Libbey Eurotext. p 407.
- Rossi, M. (2010). *radiobiologie : cours de radiobiologie et de radiopathologie pour le paces*. Université de montpellier , p 10.
- Rouëssé, J., Bouvenot, G., Meyer, F., Rochaix, L., Tubiana, M. et Lemsi, M. W. (2011). Informations sur la prescription des molécules onéreuses en cancérologie. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 195(1): 699-727.
- Seigue A. (1985) *.La Forêt Circum méditerranéenne et ses Problèmes*. Paris: Maisonneuve & Larose. p 137-139.
- Shelby, M. D. et Witt, K. L. (1995). Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests. *Environmental and molecular mutagenesis*, 25(4): 302-313.
- Small, E. et Catling, P. M. (2000). *Les cultures médicinales canadiennes*. Ottawa: Les Presses scientifiques du Conseil National de Recherches Canada. p 146.
- Sushma, C. et Rudrama, D.K. (2015). Antigenotoxic effects of *Aegle marmelos* Fruit Extract in Cyclophosphamide Induced Chromosomal Aberrations and Aberrant Sperms in Germ Cells of Swiss Albino Mice. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 3(5): 178-183.
- Taylor, C., Wallace, M. et Monica, G. (2014). *Anthocyanins in health and disease* .New York :CRC press.p227.

Villar, A., Sanz, M. J. et Payo, M. (1987). Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *international journal crude drug research*, 25:1-3.

Willam, K., Michael, C. et Charlotte, S. (2006). *Genetique*. Paris :Nouveaux Horizons .8.p447-460.

Weixing . W, Q, Y., Rocca, J. R., Sarnoski, P. J., Jia, A. et Gu, L. (2015). Scavenging of Toxic Acrolein by Resveratrol and Hesperetin and Identification of Adducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(43):9488-9495.

Xiong, Y. A., Yu, Q. N., Zou, J. B., He, Y. H., Zhang, S. J., Xu, R. C. et Yang, M. (2014). Protective Effects of Tannins in *Sanguisorbae Radix* on Myelosuppression Mice. *Chinese Herbal Medicines*, 6(3):222-227.

Yaaqobi, A., El Hafid, L. et Haloui, B. (2009). Etude biologique de *Pistacia atlantica* Desf. de la région orientale du Maroc. *Biomatec Echo*, 3(6):39-49.

Zitouni, M. (2014). *Nouvelle vision stratégique. Plan National Cancer :centrée sur le malade*. Alger : Agence Nationale de Documentation de la Santé. p19.

Résumé :

Pistacia lentiscus est une plante utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maladies : diarrhée, maux de haut de l'abdomen.

L'objectif de cette investigation est l'évaluation des effets protecteurs des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* sur la génotoxicité induite par le cyclophosphamide et de ses effets génotoxiques probables.

Les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines à 250, 500 et 1000 mg/kg ont été testés par la méthode des aberrations chromosomiques. Le cyclophosphamide (50mg/kg) a été utilisé comme contrôle positif et le carboxy methylcellulose (0.8%) comme contrôle négatif.

Les résultats ont montré que les extraits n'entraînaient pas une modification significative des indices mitotiques et les pourcentages des cellules aberrantes comparés aux témoins négatifs. Par contre, les extraits à 250 mg/kg associés au cyclophosphamide ont montré une différence significative ($^{###}P < 0.001$) de l'indice mitotique comparé aux témoins positifs. De plus, une différence non significative est marquée entre ces derniers et le pourcentage des cellules aberrantes. Les résultats de ces tests démontrent que les extraits des feuilles et des écorces des racines non aucun effet cytotoxique ni génotoxique. Par contre la concentration 250mg/kg possède un effet cytoprotecteur.

Les résultats obtenus de ce travail confirment une fois de plus les effets bénéfiques et cytoprotecteurs de *Pistacia lentiscus*.

Mots clés : cancer, cyclophosphamide, *Pistacia lentiscus*, souris, aberrations chromosomiques.

Abstract:

Pistacia lentiscus is a plant traditionally used in the treatment of several diseases: diarrhea, upper abdominal pain. The aim of investigation is the evaluation of the protective effects of extracts of the leaves and roots bark of *Pistacia lentiscus* against genotoxicity induced by cyclophosphamide and its likely genotoxic effects.

The ethanolic extracts from the leaves and roots bark of 250, 500 and 1000 mg /kg were tested by the method of the chromosomal aberrations. Cyclophosphamide (50mg/kg) was used as a positive control and carboxy methylcellulose (0.8%) as a negative control.

The results showed that the extracts did not cause a significant change in mitotic index compared and percentage of the aberrant cells to the negative controls. On the other hand, the extracts with 250 mg/kg associated with the cyclophosphamide showed a significant difference ($^{###}P < 0.001$) of the index mitotic compared to the positive control. Moreover, one non-significant difference is marked between this last and the percentage of the aberrant cells. The results of these tests show that leaves and roots bark of the extracts did not have any cytotoxic nor genotoxic effects. However, the concentration 250 mg /kg exhibits a cytoprotective effect.

The results obtained of this work once more confirms the beneficial and cytoprotectives effects of *Pistacia lentiscus*.

Key words: cancer, cyclophosphamide, *Pistacia lentiscus*, mouse, chromosomal aberrations.

ملخص :

الضرو نبات يستخدم عادة في علاج العديد من الأمراض : الإسهال ، آلام في البطن العلوي . الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثيرات الواقية لمستخلص من مقتطفات الأوراق و لحاء جذور الضرو ضد السمية الوراثية الناجمة عن السيكلوفوسفاميد و آثارها على السمية الوراثية .

مستخلصات الايثانول من الأوراق و لحاء جذور 250 و 500 و 1000 ملغ / كغ تم اختبارها من خلال طريقة الانحرافات الكروموسومية . استخدم سيكلوفوسفاميد (50 ملغ / كغ) للمجموعة السيطرة الموجبة و كربوكسي ميثيل السيلولوز (0.8 ٪) للمجموعة السيطرة السالبة .

أظهرت النتائج أن هذه المستخلصات لم تحدث تغييرا كبيرا في مؤشر الانقسامية و نسبة تشوهات الكروموسومية مقارنة مع الضوابط السلبية . لكن أظهرت مقتطفات 250 ملغ / كغ المرتبطة بالسيكلوفوسفاميد فرق كبير ($^{###}P < 0.001$) في مؤشر الانقسامية مقارنة مع الضوابط الإيجابية . بالإضافة إلى ذلك لم يتم ملاحظة الفرق ملحوظ بين هذا الأخير و نسبة تشوهات الكروموسومية . تظهر نتائج هذه الاختبارات أن المستخلص لمقتطفات الأوراق و لحاء جذور الضرو ليست سامة للخلايا ولا للجينات . إن تركيز المعارض 250 ملغ / كغ له تأثير وقائي خلوي .

النتائج التي تم الحصول عليها من هذا العمل تؤكد مرة أخرى ان الضرو له آثار المفيدة و الوقائية للخلية .

كلمات البحث : السرطان ، السيكلوفوسفاميد ، الضرو ، الفتران ، انحراف الكروموسوم .