

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

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département Biologie physico-chimique**  
**Spécialité Biochimie appliquée**



Réf : .....

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

**MASTER**

**Thème**

**Investigation de l'effet cytoprotecteur des  
Antioxydants contre le stress oxydatif  
Induit par les anticancéreux**

Présenté par :

**OUALI Assia & NEHAL Zoulikha**

Soutenu le : **23/09/2021**

**Devant le jury composé de :**

Mme KASMI S.	MAA	Présidente
Mme. BENSALÉM-BOURNINE S.	MCA	Promotrice
Mme OURABAH-BOUDJOUANE A.	MCB	Examinatrice

**Année universitaire : 2020/2021**

# Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Allah, le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et sincères remerciements à notre promotrice **Mme BENSALÉM-BOURNINE S**, qui nous a accompagnés durant cette période de travail avec une grande rigueur scientifique, pour les conseils que vous nous avez accordé tout au long de la préparation de notre mémoire. Merci également pour votre encadrement, patience, confiance et gentillesse, votre grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons également rendre notre profonde reconnaissance à **Mr BOURNINE Lamine**, pour son aide, sa disponibilité, sa précieuse attention, ses encouragements et ses conseils pour mener à bien ce travail.

Notre grande considération et notre vive reconnaissance vont aux membres de jury, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer et de juger notre travail.

Nous remercions aussi le personnel des laboratoires de la faculté SNV de l'université de Bejaia, de nous avoir ouvert les portes et de mettre à notre disposition l'ensemble des moyens et matériel souhaité.

Nos sincères remerciements vont également à l'ensemble du personnel du centre de transfusion sanguine (**CTS**) de Bejaia ainsi qu'au personnel du service d'oncologie du centre de **Sidi Ali Labhar** de Bejaia qui nous a aidés et mis à notre disposition le matériel nécessaire pour réaliser notre travail pratique.

Enfin, nous tenons à remercier nos très chères familles pour leurs encouragements et leur soutien, et à remercier aussi tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, pour la réalisation de ce travail.

## *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie Allah qui m'a éclairé mon chemin et d'aboutir au moment que j'ai l'attendu.*

*Je dédie ce modeste travail*

*À ma très chère mère, celle qui m'a donné à la vie, qui s'est sacrifié pour mon bonheur et mon éducation et ma réussite.*

*À mon cher père, qui a été mon ombre durant toutes les années d'études, qui a veillé à me donner l'aide, à m'encourager et me protéger.*

*À mes chères sœurs, Warda, Nawal et Meriem*

*À mes chers frères Farid, Soufiane, Riad, Hasim et Mohamed*

*À toute la famille Nehal et Kadri*

*À ma chère binôme Assia*

*À toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment.*

*Loufikha*

## Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes chers parents, Nadia et Abderrahmane, à mes deux frères Farouk et Islam et à ma sœur Sara qui ont été toujours à mes côtés.

À ma famille scientifique et tous les enseignants et professeurs qui m'ont formée.

À mon grand père décédé qui a veillé à me donner de l'aide et à m'encourager.

À mon oncle Macer et sa petite famille, pour son soutien et encouragements.

À mes chers oncles Fateh, Samir et Omar et à mes chers tantes.

À toute ma famille, source de motivation et de bonheur.

À ma chère amie Melissa, qui était souvent à mes côtés dans les moments qui comptent pour moi.

À ma chère binôme Zoulikha avec qui j'ai réalisé ce mémoire.

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

*Assia*

## Liste des abréviations

**AGPI** : Acides gras poly insaturés

**CAT** : Catalase

**CIA** : Anémie chimio induite

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**DOX** : Doxorubicine

**GHS** : Glutathion

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GRs** : Globules rouge

**Hb** : Hémoglobine

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HzB** : Corps de Heinz

**MDA** : Malondialdéhyde

**MetHb** : Méthémoglobine

**MPO**: Myéloperoxydase

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NADPH** : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate

**NO** : Monoxyde d'azote

**NOS** : Nitrite oxyde synthèse

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde

**OH**: Radical hydroxyle

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**: Oxygène singulier

**PTX** : Paclitaxel

**RLs** : Radicaux libres

**ROO-** : Radical peroxy

**SH:** Sulfedryles

**SO:** Stress oxydant

**SOD:** Superoxyde dismutase

**$\alpha$ -TOH :**  $\alpha$ -tocophérol

**UV:** Ultraviolet

**VIT C:** Vitamine C

**VIT E :** Vitamine E

**VP 16:** Etoposide

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Frottis de sang normal coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG).....	08
<b>Figure 02 :</b> Structure de la membrane érythrocytaire.....	08
<b>Figure 03 :</b> Structure de l'hémoglobine.....	09
<b>Figure 04 :</b> Structure de la Méthémoglobine fixant le fer oxydé sur un radical hydroxyl...	09
<b>Figure05 :</b> Espèces réactive de l'oxygéné (ERO) et les systèmes de defense limitant leurs effets toxiques.....	11
<b>Figure 06 :</b> Structure de l'acide ascorbique.....	12
<b>Figure 07 :</b> Régénération de la vitamine E par la vitamine C .....	13
<b>Figure 08 :</b> Protocole expérimentale de l'effet cytoprotecteur de la vitamine C et de la vitamine E contre le stress oxydant induit par les anticancéreux.....	18
<b>Figure 09 :</b> Concentration cellulaire après traitement par le vit C (0,1 mg/ml), la vit E (0,25 mg/ml) et par la combinaison vit C+E.....	20
<b>Figure 10 :</b> Taux de MetHb générée après traitement avec la vitamine C (0,1mg /ml), la vitamine E (0,25 mg/ml) et par la combinaison vit C + vit E.....	21
<b>Figure 11 :</b> Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec la vitamine C (0,1 mg/ml), la vitamine E (0,25 mg/ml) et par la combinaison vit C + E.....	21
<b>Figure 12 :</b> Quantité de d'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml) et par la combinaison vit C + E.....	22
<b>Figure 13 :</b> Concentration cellulaire après traitement par le paclitaxel (0,6mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	23
<b>Figure 14 :</b> Concentration cellulaire après traitement par le paclitaxel (0,3mg/ml) et la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	24
<b>Figure 15 :</b> Taux de méthémoglobine après traitement par le paclitaxel (0,6mg/ml) et la vitamine C (0,25mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	25

<b>Figure 16</b> : Taux de méthémoglobine après traitement par le paclitaxel (0,3mg/ml) et la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	26
<b>Figure 17</b> : Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,6mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	27
<b>Figure 18</b> : Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,3mg/ml) et par la vitamine E (0,25mg/ml).....	27
<b>Figure 19</b> : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,6mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	28
<b>Figure 20</b> : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,3mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	29
<b>Figure 21</b> : Concentration cellulaire après traitement par l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).....	30
<b>Figure 22</b> : Concentration cellulaire après traitement par l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml ; 2mg/ml).....	31
<b>Figure 23</b> : Taux de méthémoglobine après traitement par l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml ; 2mg/ml).....	32
<b>Figure 24</b> : Taux de méthémoglobine après traitement par l'etoposide (0,2mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (2mg/ml).....	33
<b>Figure 25</b> : Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec l'etoposide (0,4mg/ml ; 0,2mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml). ....	34
<b>Figure 26</b> : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml ; 2mg/ml).....	35
<b>Figure 27</b> : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec l'etoposide (0,2mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (2mg/ml).....	35

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Mécanisme d'action des agents de chimiothérapie.....	02
<b>Tableau II :</b> Différentes classes des ERO.....	05
<b>Tableau III :</b> Description des anticancéreux utilisés.....	15
<b>Tableau IV :</b> Concentration utilisée pour chaque anticancéreux.....	16

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>01</b>
<b>I. Synthèse bibliographique .....</b>	<b>02</b>
<b>I.1. Agents de la chimiothérapie .....</b>	<b>02</b>
I.1.1. Généralités sur la chimiothérapie .....	02
I.1.2. Classification et mécanisme d'action des agents de chimiothérapie .....	02
I.1.3. Effets secondaires des agents de chimiothérapie.....	03
<b>I.2. Stress oxydant induit par la chimiothérapie .....</b>	<b>04</b>
<b>I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>04</b>
I.2.1.1. Classification des ERO.....	04
I.2.1.2. Origine du stress oxydant .....	05
I.2.2. Cibles principales des ERO .....	06
<b>I.2.3. Stress oxydant chimio-induit.....</b>	<b>06</b>
I.2.3.1. Stress oxydant induit par le paclitaxel.....	06
I.2.3.2. Stress oxydant induit par la doxorubicine .....	06
I.2.3.3. Stress oxydant induit par l'etoposide.....	06
<b>I.2.4. Stress oxydant et toxicité hématologique .....</b>	<b>07</b>
I.2.4.1. Thrombopénie.....	07
I.2.4.2. Neutropénie .....	07
I.2.4.3. Anémie .....	07
<b>I.2.5. Erythrocytes comme cible principale du stress oxydant chimio-induit.....</b>	<b>08</b>
<b>I.2.6. Oxydation de l'hémoglobine et mécanisme de la genèse de la méthémoglobine</b> <b>.....</b>	<b>09</b>
<b>I.2.7. Mécanisme de l'anémie chimio-induit.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3. Systèmes de défense antioxydants.....</b>	<b>10</b>
I.3.1. Généralité sur les antioxydants .....	10
I.3.2. Classification des antioxydants .....	11
I.3.2.1. Système de défense enzymatique (endogène) .....	11
I.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques.....	11
I.3.3. Effet cytoprotecteur des substances naturelles contre l'oxydation induite par les anticancéreux.....	13
<b>II. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>14</b>
II.1.1. Appareils et équipements utilisés.....	14

II.1.2. Produits et réactifs.....	14
II.1.3. Présentation des agents de chimiothérapie utilisés .....	15
<b>II.2. Méthodes .....</b>	<b>15</b>
II.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	15
II.2.2. Préparation des solutions des anticancéreux .....	15
II.2.3. Préparation des solutions d'antioxydants .....	16
II.2.4. Etude de la cytotoxicité des antioxydants .....	16
II.2.5. Etude de la cytotoxicité des anticancéreux seuls ou combinés avec les antioxydants .....	16
II.2.5.1. Test de turbidité cellulaire.....	16
II.2.5.2. Dosage de la méthémoglobine et de l'hémoglobine libérée .....	17
II.2.5.3. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire.....	17
II.2.6. Analyse statistique.....	19
<b>III. Résultats et discussion .....</b>	<b>20</b>
III.1. Etude de la cytotoxicité des vitamines C et E sur le globule rouge.....	20
III.1.2. Etude de l'effet des vitamines C et E sur l'hémoglobine.....	20
III.1.2.1. Taux de la méthémoglobine générée .....	20
III.1.2.2. Taux de l'hémoglobine libérée .....	21
III.1.2.3. Taux de l'hémoglobine intracellulaire .....	22
III.2.1. Effet de la vitamine C et de la vitamine E combiné aux paclitaxel sur le globule rouge .....	22
III.2.2. Effet de la vitamine C et E combinées au paclitaxel sur l'hémoglobine .....	25
III.2.2.1. Taux de la méthémoglobine générée .....	25
III.2.2.2. Taux de l'hémoglobine libérée .....	26
III.2.2.3. Hémoglobine intracellulaire.....	28
III.3.1. Effet de la vitamine C et la vitamine E combiné à l'etoposide sur le globule rouge .....	29
III.3.2. Etude de l'effet vitamines C et E combinés à l'etoposide sur l'hémoglobine ....	30
III.3.2.1. Taux de la méthémoglobine générée .....	31
III.3.2.2. Taux de l'hémoglobine libérée .....	33
III.3.2.3. Hémoglobine intracellulaire.....	34
<b>Conclusion .....</b>	<b>36</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>37</b>

# **Introduction**

## Introduction

L'incidence du cancer croît considérablement dans les dernières années, Il constitue une des principales causes de mortalité dans le monde (**Jacques et al., 2021**), à l'origine de près de 10 millions de décès en 2020 selon le journal international du cancer (**IJC 2020**).

Le cancer occupe un axe principal dans la recherche scientifique et de nombreux traitements ont été mis en place, les plus courants sont la radiothérapie, la chirurgie et la chimiothérapie qui peut être utilisée seule ou en association avec d'autres traitements. Bien que la chimiothérapie soit le traitement le plus efficace, elle est associée à de multiples effets secondaires tels que l'anémie, qui a un impact négatif sur la qualité de vie des patients (**Faridi et al., 2017**).

Les agents de chimiothérapie tels que l'etoposide, la doxorubicine et le paclitaxel exercent leur effet par un mécanisme qui implique la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Kanchana et al.,2013 ;Singh et al., 2017**). Ces derniers engendrent un stress oxydant (SO) dans les cellules cancéreuses mais aussi dans les cellules normales notamment les érythrocytes, en altérant leurs membranes et en oxydant l'hémoglobine (**Mameri et al., 2021**), ce qui induit une anémie hémolytique.

Les antioxydants constituent un arsenal de défense contre les dommages oxydatifs en neutralisant les radicaux libres (**Baudin et al., 2020**). En outre, ces dommages oxydatifs causés par les anticancéreux peuvent être réduits par le renforcement du système antioxydant de l'organisme. Quelques études antérieures ont été menées pour évaluer l'effet protecteur des antioxydants (vitamine C et E) à l'égard des dommages oxydatifs induits par quelques anticancéreux utilisés en thérapie clinique (**Faridi et al., 2017**).

Notre étude consiste à explorer l'effet cytoprotecteur de la vitamine C et de la vitamine E ainsi que leur combinaison contre le stress oxydant induit par les anticancéreux sur les érythrocytes sains, *in vitro*, en mesurant différents paramètres à savoir la turbidité cellulaire, le taux de la méthémoglobine générée, le taux d'hémoglobine intacte libérée et intracellulaire.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

## I.1. Agents de la chimiothérapie

### I.1.1. Généralités sur la chimiothérapie

Les anti-cancéreux sont des médicaments utilisés au cours du traitement de différents types de cancer, tels que le cancer du sang, le cancer du sein, le cancer des testicules, et plusieurs autres types de cancer (**Krukiewicz et al., 2016**).

La classification des thérapies anti-cancéreuses regroupe trois familles qui sont l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie (**Espinosa et al., 2003**).

Malgré le progrès crucial de l'immunothérapie, la chimiothérapie reste la première ligne de traitement du cancer. Cette thérapie consiste à administrer des agents cytostatiques ou cytotoxiques dans le but de bloquer et d'interrompre les voies de division des cellules cancéreuses. Cela diminue ainsi la progression du cancer par l'inhibition de la formation des métastases voir de l'arrêter (**Mackey et al., 2020**).

### I.1.2. Classification et mécanisme d'action des agents de chimiothérapie

Les différents médicaments utilisés au cours de la chimiothérapie induisent des dommages cellulaires importants tout en agissant par divers modes d'actions (tableau I) (**Akhlaghi et al., 2020**).

**Tableau I : Mécanisme d'action des agents de chimiothérapie**

Agents de chimiothérapie	Exemples	Mécanismes d'actions	Références
Agents alkylants	-Ifosfamide -Sels de platines (cisplatine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blocage et inhibition de la réplication d'ADN.</li> </ul>	( <b>Raina et Agrawal, 2007</b> )
Inhibiteurs de topo isomérase I et II	- Topotécan - Etoposide	<ul style="list-style-type: none"> <li>Présentent une structure ternaire qui leurs permettent de s'insérer entre les deux brins d'ADN.</li> </ul>	( <b>Espinosa, 2003 ; Albet et al., 2009</b> )
Anti-métabolites	- 5-Fluorouracile - Gemécitabine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sont des analogues structuraux des bases purique, pyrimidique ainsi que des coenzymes foliques.</li> </ul>	( <b>Peters et al., 2000 ; Bachy et al., 2015</b> )
Anti-microtubules	- Taxotère	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibent la polymérisation des microtubules et favorisent la polymérisation des micro-tubulines.</li> </ul>	( <b>chechi et al., 2003 ; cortes et al., 2007 ; Mumhtar et al., 2014</b> )

### I.1.3. Effets secondaires des agents de chimiothérapie

Tous les agents de chimiothérapie présentent une gamme d'effets secondaires graves en raison de leur sélectivité insuffisante pour les tissus cancéreux. Les cibles principales des anticancéreux sont les cellules à prolifération rapides (cellules cancéreuses) par ailleurs, d'autres cellules normales peuvent être en état de prolifération et de croissance rapide qui seront donc une cible de ces agents. Plusieurs tissus peuvent être affectés, on peut citer les muqueuses de la bouche, de la gorge, de l'intestin et de la moelle osseuse (**Oun et al., 2018**).

L'efficacité des agents de chimiothérapie pour traiter les métastases est approuvée, mais ces agents présentent une toxicité intense pour les cellules normales, notamment pour le système hématopoïétique qui est le précurseur de toutes les cellules sanguines. D'autres effets néfastes peuvent avoir lieu lors des cures de chimiothérapie ce qui limite son utilisation à forte dose (**Singh et al 2017; Mameri et al., 2021**). Parmi les effets qui peuvent être engendrés sont: une néphrotoxicité, une hépatotoxicité, alopecie, neurotoxicité, cardiotoxicité et hématotoxicité (**Oun et al., 2018**).

La génération des radicaux libres (RLs) semble être le mécanisme clé par lequel les agents de chimiothérapie exercent leurs effets et agissent sur la cellule cancéreuse. L'augmentation du taux des RLs induit un stress oxydatif dans la cellule cible mais aussi dans la cellule normale et par conséquent les molécules biologiques (ADN, protéines et lipides) subissent des dommages oxydatifs via différents mécanismes (**Vanessa et al., 2013**).

## I.2. Stress oxydant induit par la chimiothérapie

Le stress oxydant s'installe lorsque les capacités de défenses antioxydantes sont dépassées (**Bardyn et al., 2018**). Il se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les antioxydants de l'organisme. Produits de façon continue et élevée, l'accumulation de ces ERO dans la cellule engendre des dommages cellulaires importants et irréversibles (**Baudin et al., 2020**).

### I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

Un radical libre (RL) se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un électron non apparié (célibataire) sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante. Les RLs réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (**Belkhiri, 2017**).

La production des ERO est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'oxygène pour produire de l'énergie au cours des réactions de respiration oxydative. Cependant, une faible partie d'O<sub>2</sub> s'échappe lors de sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie qui peut être à l'origine de la genèse des ERO (**Sies et al., 2020**).

Les ERO sont synthétisées dans les processus physiologiques comme la transduction du signal, les réactions immunitaires, les réactions inflammatoires, la lutte contre les infections virales et bactériennes, l'apoptose des cellules tumorales ainsi que le fonctionnement des enzymes et des neurones. Néanmoins ces ERO sont éliminés après avoir exercé leurs effets par des systèmes antioxydants spécifiques selon leur localisation cellulaire (**Alfadda, 2012 ; Tong, 2015**).

#### I.2.1.1. Classification des ERO

On distingue deux groupes des ERO à savoir les espèces réactives radicalaires et non radicalaires (tableau II).

**Tableau II** : Les différentes classes des ERO

<b>Espèces radicalaires</b>	<b>Espèces non radicalaires</b>	<b>Références</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'anion super oxyde (<math>O_2^{\cdot-}</math>)</li> <li>- Le radical hydroxyle (<math>\cdot OH</math>)</li> <li>- Le radical pyroxyde (<math>ROO\cdot</math>)</li> <li>- Le monoxyde d'azote (<math>NO\cdot</math>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Le peroxyde d'hydrogène (<math>H_2O_2</math>)</li> <li>- L'oxygène singlet (<math>^1O_2</math>)</li> <li>- Le nitroperoxyde (<math>ONOOH</math>)</li> </ul>	<p><b>(Lushchak, 2014 ; Sies, 2020)</b></p>

### I.2.1.2. Origine du stress oxydant

Il existe plusieurs origines de la production des ERO dans l'organisme, ces espèces peuvent se produire de manière endogène via les enzymes et compartiments cellulaires ou de manière exogène par l'intermédiaire de facteurs externes et le mode de vie de l'individu (Belkhiri, 2017).

Les études ont démontré que la production d'oxydants à partir de ces sources endogènes et exogènes augmente en fonction de l'âge et varie selon les conditions physiopathologiques de l'individu (Warraich et al., 2020).

#### a) Origine endogène

Les métabolismes cellulaires et les différents processus physiologiques génèrent des quantités importantes des RLs. La chaîne de transport mitochondriale constitue un site endogène majeur des RLs via les enzymes NADPH oxydases transmembranaires qui occupent différentes localisations, les lipoxygénases et les cyclooxygénases génèrent des oxydants réactifs comme intermédiaires dans le processus d'activation et du contrôle inflammatoire. Dans des conditions d'hypoxie la production des RLs est assurée par la xanthine oxydase (Lavranos, 2012; Lushchak, 2014). D'autres organites peuvent être à l'origine de la production des RLs dans plusieurs situations, conduisant par ailleurs, à l'induction d'un stress oxydant (SO) endogène tels que : le cytochrome hépatique P450, les leucocytes ainsi que la cellule tumorale (Tong, 2015).

#### b) Origine exogène

Les différentes sources exogènes des ERO sont la pollution de l'air et de l'eau, le tabagisme, l'alcool, les métaux lourds ou de transitions, la consommation de certains médicaments, les solvants industriels et les radiations ionisantes qui sont métabolisés en RLs (Liguori, 2018).

### **I.2.2. Cibles principales des ERO**

L'ADN, les protéines et les lipides constituent les principales biomolécules de l'organisme, l'intégrité de ces molécules peut être altérée par l'accumulation des ERO et un fort potentiel du SO. Pour que les RLs se stabilisent, ils arrachent des électrons à partir des molécules biologiques et engendrent ainsi des réactions radicalaires en chaîne notamment en cas de déficience en antioxydants (**Cooke, 2003 ; Li et al., 2017 ; Sies, 2020**).

### **I.2.3. Stress oxydant chimio-induit**

Les anticancéreux exercent leur effet thérapeutique par un mécanisme impliquant l'induction d'un SO important via l'augmentation du taux des ERO afin de provoquer l'apoptose de la cellule cancéreuse (**Tong, 2015**).

#### **I.2.3.1. Stress oxydant induit par le paclitaxel**

Le paclitaxel (PTX) est un agent de fuseau mitotique, c'est l'un des dérivés de taxanes. Il constitue la première ligne de traitement des tumeurs solides. Le PTX induit un SO dans la cellule tumorale et dans la cellule normale via l'augmentation de l'activité de NADPH oxydase (NOX) et l'accumulation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de l'<sup>•</sup>O<sub>2</sub> (**Tabaczar et al., 2013**).

#### **I.2.3.2. Stress oxydant induit par la doxorubicine**

La doxorubicine (DOX) est une anthracycline, un agent intercalant utilisé dans le traitement de divers cancers. Les cibles subcellulaires majeures de la DOX sont les cardiomyocytes à cause de leur richesse en mitochondries, au cours du traitement par la DOX. Une grande quantité des ERO est produite par réduction du cycle redox au niveau du complexe I de la chaîne mitochondriale ce qui génère le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le OH<sup>•</sup> et l'<sup>•</sup>O<sub>2</sub> qui sont hautement impliqués dans la perturbation de la membrane via la peroxydation lipidique, un dysfonctionnement des protéines et de l'ADN. La DOX participe aussi à la réaction de Fenton et forme ainsi des complexes DOX-ferritine ce qui induit des lésions hémolytiques des érythrocytes (**Tabaczar, 2013 ; Ma et al., 2017 ; Songbo, 2019**).

#### **I.2.3.3. Stress oxydant induit par l'etoposide**

L'etoposide (VP16) est un agent alkylant qui inhibe la topo-isomérase II, il s'agit d'un dérivé synthétique de podophyllotoxine. Le VP16 génère des RLs tels que le radical phenoxy lors de sa biotransformation en métabolites actifs. Il oxyde fortement les groupements thiols intracellulaires, provoque aussi des dommages importants d'ADN et de

lipides membranaires et affecte l'activité des antioxydants enzymatiques (SOD, GSH-PX, et CAT) (Valerian, 2001 ; Kanchana *et al.*,2013).

#### **I.2.4. Stress oxydant et toxicité hématologique**

Le sang est un tissu conjonctif fluide constitué des éléments cellulaires qui comprennent les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes et d'une matrice extracellulaire qui est le plasma. Les éléments figurés du sang sont susceptibles d'être des cibles d'un SO induit par leur contacte directe avec les anticancéreux administrés notamment par voie intraveineuse, ou par une oxydation indirecte lors du métabolisme de ces agent antinéoplasiques qui génèrent des métabolites réactifs induisant des altérations hématologiques. Comme aussi les anticancéreux peuvent exercer un effet myelosuppresseur sur la moelle osseuse (Panis *et al.*, 2012 ; Remesh, 2012).

##### **I.2.4.1. Thrombopénie**

Une thrombopénie désigne un taux faible de plaquettes, (thrombocytes <150 g/l). Ces dernières ont un rôle dans la coagulation du sang. La thrombopénie constitue une complication fréquente chez les patients recevant des cures de chimiothérapie. La prise en charge des patients fait appel à une transfusion des plaquettes et/ou une diminution des doses de chimiothérapie (Panis *et al.*, 2012; Remesh 2012).

##### **I.2.4.2. Neutropénie**

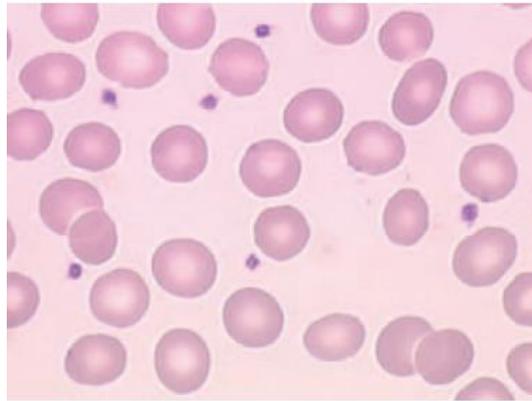
La neutropénie se définit par une chute accru de polynucléaires neutrophiles, résultant d'une atteinte de la moelle osseuse et d'un effet cytotoxique sur les neutrophiles qui tapissent le tube digestif. Ceux-ci a pour conséquence une prédisposition des patients à des infections et à des invasions bactériennes car les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre l'infection en tant que premier composant cellulaire de la réponse inflammatoire (Crawford *et al.*, 2004).

##### **I.2.4.3. Anémie**

L'anémie est l'anomalie hématologique la plus fréquente et la plus persistante chez les patients cancéreux. L'anémie chimio-induite (ACI) est une conséquence de l'invasion maligne du tissu normal conduisant à une diminution du taux des érythrocytes, une infiltration de la moelle osseuse avec perturbation de l'érythropoïèse et une carence fonctionnelle en fer (Brayer *et al.*, 2018).

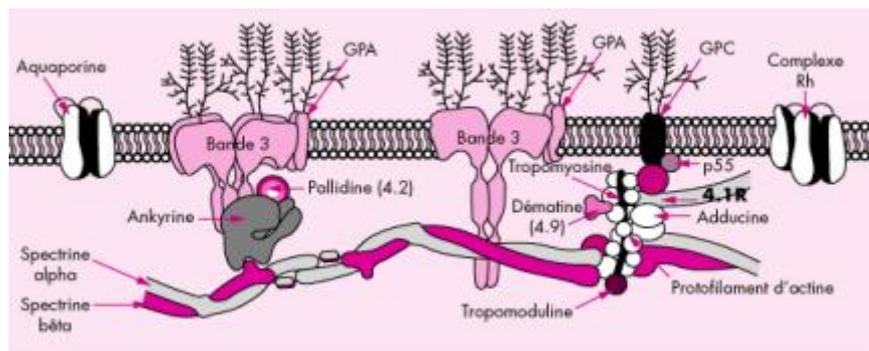
### I.2.5. Erythrocytes comme cible principale du stress oxydant chimio-induit

Les érythrocytes sont des cellules anucléées qui émergent de la moelle osseuse, elles sont dépourvues des organites (figure 01) et perdent leur capacité de synthèse des protéines. Cependant, en raison de la teneur élevée en O<sub>2</sub> dans le sang artériel et en fer (Fe) dans l'hème, les ERO sont continuellement produites dans les globules rouges (GRs). Les érythrocytes transportent une grande quantité d'oxygène au cours de leur vie, ce qui entraîne un stress oxydant. Ce dernier est équilibré par les systèmes de défenses antioxydants des GRs et par le transport de l'oxygène par l'Hb (Çimen, 2008).



**Figure 01 :** Frottis de sang normal coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG). (Valens 2005)  
Grossissement  $\times 1\ 000$ .

La membrane érythrocytaire est constituée d'une bicouche lipidique composée de 50% de protéines, de 40% de lipides et de 10% de glucides (figure 02) (Valens 2005).

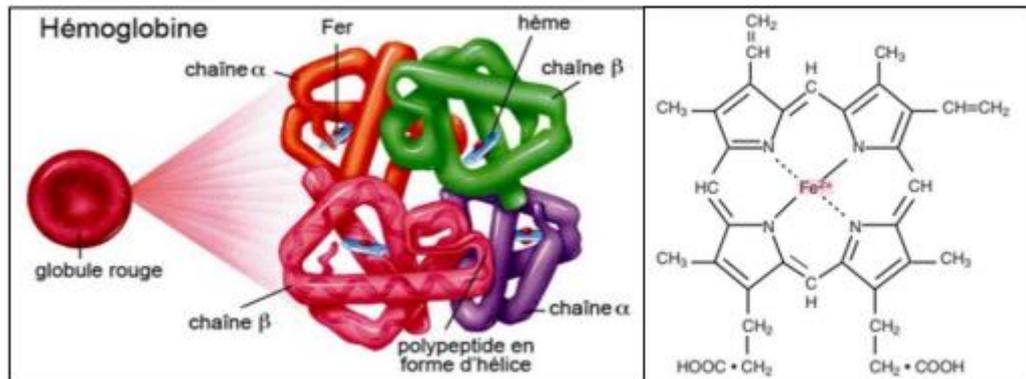


**Figure 02 :** Structure de la membrane érythrocytaire (Gascard et al., 2000).

GPA : glycophorine A, GPC: glycophorine C

L'Hb constitue 95 % des protéines cytoplasmiques, elle a comme fonction principale le transport de l'O<sub>2</sub> du poumon vers les tissus et du CO<sub>2</sub> des tissus vers les poumons. L'Hb est composée de quatre chaînes de globine polypeptidique sous forme d'hélice désignée par  $\alpha 1/\alpha 2$  et  $\beta 1/\beta 2$  (figure 03). Chaque globine est liée à une molécule de l'hème qui renferme

un atome de fer à l'état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en position centrale qui a son tour peut se lier à une molécule d'oxygène. Par conséquent, chaque molécule de l'Hb peut transporter quatre molécules d' $\text{O}_2$  (Burak., 2008 ; Baudin, 2020).



**Figure 03 :** Structure de l'hémoglobine (Kenneth et al.,2016)

L'Hb peut subir une auto-oxydation lors de la réduction occasionnel de l' $\text{O}_2$  en  $\text{O}_2^-$  ce qui génère une forme oxydée de l'Hb dite méthémoglobine (MetHb) qui fixe le fer oxydé sur un radical (figure 04) hydroxyle (Burak, 2008 ; Wajcam, 2005).



**Figure 04 :** Structure de la méthémoglobine fixant le fer oxydé sur un radical hydroxyle (Wajcman 2005).

### I.2.6. Oxydation de l'hémoglobine et mécanisme de la genèse de la méthémoglobine

Dans les érythrocytes circulants et qui sont exposés à l'oxyde nitrique (NO), l'Hb s'oxyde en MetHb et se produit en continu et spontanément, non seulement par les ERO mais aussi via les espèces réactives du nitrogène (ERN). La Méthémoglobinémie survient lorsque le taux de MetHb est supérieur à 1% de la teneur totale en Hb dans la cellule, bien qu'aucun symptôme clinique ne soit observé jusqu'à ce que le niveau de MetHb atteigne 10% de la teneur totale. La genèse de la MetHb peut être à l'origine de deux mécanismes à savoir :

- Oxydation directe de l'Hb liée à l'activité de la nitrite oxyde synthase (NOS) ;
- Augmentation de l'activité de la deoxyHb nitrite réductase.

L'augmentation du taux de la MetHb dans les érythrocytes conduit à l'apparition de l'anémie liée au stress oxydant, ceci altère l'homéostasie de l'oxygène et induit l'hypoxie dans les tissus (Ayako et al.,2007 ; Gregory et al.,2012).

### **I.2.7. Mécanisme de l'anémie chimio-induit**

Les érythrocytes constituent une cible majeure des ERO générées par certains anticancéreux contenant une fraction quinone, administrés notamment par voie intraveineuse. L'augmentation des ERO affecte l'homéostasie cellulaire par un impact direct sur la membrane érythrocytaire à cause de sa richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI), qui sont dégradés par le processus de peroxydation lipidique. Ceci génère des malonyldialdéhydes (MDA) entraînant ainsi une dépolarisation membranaire, une perte de la fluidité et une altération des enzymes et transporteurs membranaires (Mameri et al., 2021).

L'hémoglobine à son tour peut subir des dommages oxydatifs suite à une dénaturation des globines et formation des agrégats appelés corps de Heinz (HzB). Ces composés possèdent une forte affinité aux protéines membranaires, ce qui provoque son altération. Aussi, la génération de la méthémoglobine qui produit un taux élevé de RLs. Ces derniers oxydent le glutathion réduit (GSH) ce qui induit à l'oxydation des groupements sulfedryles (SH) qui jouent un rôle majeur dans le maintien de l'état redox de la cellule (Mansouri et al., 1993).

Le SO<sub>2</sub> diminue la capacité antioxydante, endommage de manière irréversible les érythrocytes ce qui entraîne, leur dégradation par hémolyse et leur élimination de la circulation sanguine (Wang et al., 2020).

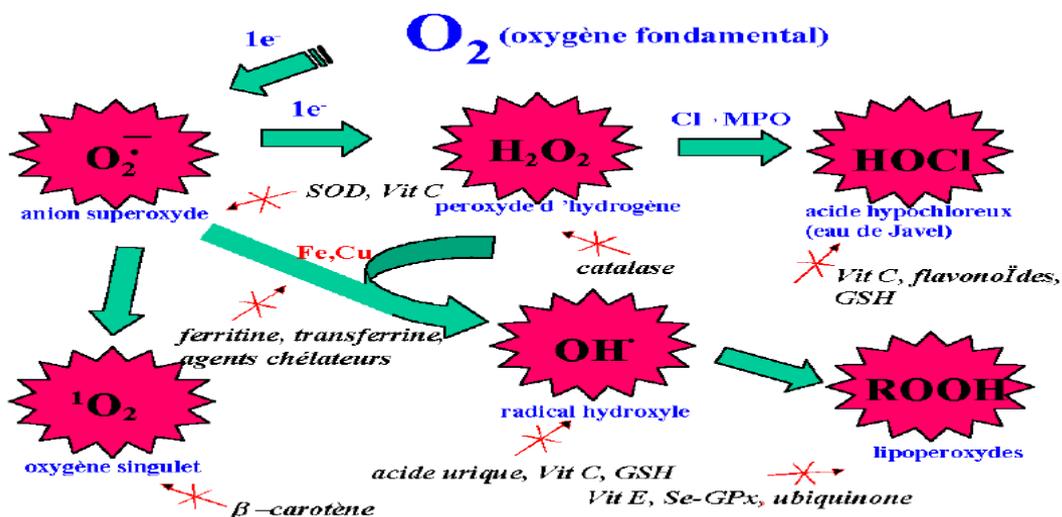
## **I.3. Systèmes de défense antioxydants**

### **I.3.1. Généralité sur les antioxydants**

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Il implique une variété de composés, à la fois d'origine endogène et exogène, qui fonctionnent de manière interactive et synergique pour neutraliser les RLs. Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit oxydable, capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation (Halliwell et Gutteridge,2007 ; Durand et al, 2013). Cette définition peut être élargie et le terme « antioxydant » englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels d'une oxydation excessive. Ce sont des

molécules capables d'interagir sans danger avec les RLs et mettre fin à la réaction en chaîne avant que les biomolécules ne soient endommagées (Favier, 2003 ; Pelli et Lyly, 2003).

Les antioxydants peuvent agir de différentes façon à savoir : piéger les ions métallique tel que le  $Fe^{2+}$ , neutraliser l'anion super oxyde pour éviter la formation de peroxydes, piéger les composés initiateurs de la réaction radicalaire (figure 05) (Yehya et al, 2015).



**Figure 05:** Les espèces réactives de l'oxygène et les systèmes de défense limitant leurs effets toxiques (Pincemail, 1998). GSH: glutathion,  $Cl^-$ : anion chlorure; MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase sélénio-dépendante.

### I.3.2. Classification des antioxydants

Selon leurs cibles et leurs modes d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

#### I.3.2.1. Système de défense enzymatique (endogène)

Le système de défense enzymatique comprend principalement trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Sharma et al, 2012). Elles sont produites de façon endogène par l'organisme, elles sont présentes pour éliminer et contrôler la production physiologique des RLs. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau d' $O_2^{\cdot-}$  et du  $H_2O_2$ , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Seyidoglu et al., 2020).

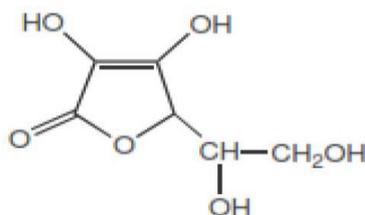
#### I.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatique sont naturellement présent dans les végétaux et les aliments et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO (Pizzino et al., 2017), limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Dans ce groupe d'antioxydants

on peut distinguer deux types : les antioxydants endogènes (le glutathion ou gamma-L-glutamyl-L-cystéine « GSH » et l'acide urique) et les antioxydants exogènes (que la vitamine E, la vitamine C, les flavonoïdes et les caroténoïdes) (**Ribeiro et al., 2001 ; Zhao et al., 2009 ; Valko, 2011**).

#### a) Vitamine C ou l'acide ascorbique

L'acide ascorbique appelé aussi la vitamine C (figure 06) se trouve dans la plupart des fruits et légumes (**Klimczak et al., 2007**). Cette vitamine n'est pas synthétisée par l'organisme, c'est une molécule hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux UV et à l'oxygène (**Fain et al., 2014**). Elle est connue pour avoir un effet protecteur contre l'oxydation des membranes (**Vergely et al., 2003**).



**Figure 06 :** Structure de l'acide ascorbique (**Diallo, 2005**)

L'acide ascorbique est un antioxydant par excellence, il permet de capter les radicaux superoxydes  $O_2^{\cdot-}$ , l'oxygène singulet, les espèces réactives de l'azote (ERN), et les radicaux hydroxyles OH. L'acide ascorbique est également impliqué dans plusieurs mécanismes antioxydants comme la réduction des oxydants solubles et de la MetHb ainsi que du système redox de la membrane plasmique. Sa capacité de donation des électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des ERO dans la phase aqueuse (**Blokhino et al., 2003; Klener et al., 2020**).

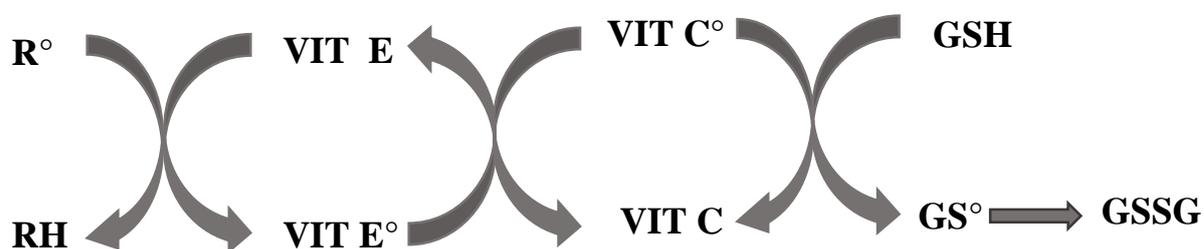
En outre, la vitamine C joue un rôle important dans la protection de diverses molécules biologiques telles que l'ADN, les protéines et les acides gras. Elle permet également la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E (**Raval et al., 2013**).

#### b) Vitamine E

La vitamine E appartient à la famille des tocophérols, molécules antioxydantes naturelles et lipophiles apportées par l'alimentation (**Toussaint et al., 2003 ; Pizzino et al., 2017**). La vitamine E existe sous quatre formes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocophénols avec une activité

antioxydante variable ; uniquement la forme  $\alpha$ - tocophérol ( $\alpha$ -TOH) semble être conservée en quantités importantes par l'organisme (Causse, 2005 ; Azzi, 2007).

La  $\alpha$ -TOH, est l'antioxydant lipophile majeur, elle intervient directement au niveau des membranes biologiques ou elle piège les RLs avant qu'ils n'atteignent leurs cibles. Elle est aussi capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec le radical OH et forme le radicale tocophéryle (figure 07). Elle empêche ou réduit l'oxydation des lipoprotéines de faibles densité LDL, mais son principal rôle biologique est de prévenir la peroxydation des lipides membranaires, *in vivo*, en capturant les radicaux peroxydes ROO<sup>•</sup> (Defraigne et al, 2007).



**Figure 07:** Régénération de la vitamine E par la vitamine C (Bossokpi, 2002)

### I.3.3. Effet cytoprotecteur des substances naturelles contre l'oxydation induite par les anticancéreux

Les anticancéreux exercent un effet toxique sur les cellules de l'organisme ce qui a poussé les chercheurs à trouver des stratégies alternatives pour réduire cette toxicité. Parmi ces stratégies, l'utilisation des substances naturelles possédant des propriétés antioxydantes et cytoprotectrices contre le SO chimio-induit (Iqbal et al., 2020). Les antioxydants naturels en particulier le tocophérol, l'acide ascorbique et les flavonoïdes sont connus pour leur efficacité à neutraliser les RLs dans le sang et dans les cellules afin de réduire les effets secondaires de la chimiothérapie sur les cellules en les protégeant des dommages oxydatifs. (Nandhakumar et al., 2013; Faridi et al., 2017). Le tocophérol et l'acide ascorbique jouent un rôle important dans la protection contre les dommages oxydatifs et la cytoproction contre la toxicité hématologique induite par les agents anticancéreux (Faridi et al., 2017).

# **Chapitre II**

## **Matériel et Méthodes**

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Matériel et méthodes**

#### **II.1. Matériel**

##### **II.1.1. Appareils et équipements utilisés**

- Balance analytique
- Centrifugeuse
- Bain Marie
- Vortex
- Spectrophotomètre à UV
- Micropipette
- Verrerie (Becher, fioles, éprouvettes)
- Barreau magnétique
- Agitateur

##### **II.1.2. Produits et Réactifs**

- Chlorure de sodium NaCl (sigma, Aldrich)
- Vitamine C (acide ascorbique)
- Vitamine E
- Paclitaxel (Ebewe)
- Etoposide (Ebewe)

### II.1.3. Présentation des agents de chimiothérapie utilisés

Les différents agents anticancéreux utilisés dans notre étude, ont été apportés au sein du service d'oncologie de Sidi Ali Elbhar, Bejaia.

Ces agents comprennent le Paclitaxel (PTX), l'etoposide (VP16).

**Tableau III** : Description des anticancéreux utilisés

Anticancéreux	Classe	Doses administrées	Type de cancer traité	Effets secondaires
Paclitaxel (PTX) 300mg/50ml	Anti-micro tubuline	0,6mg/ml	-Ovaire -Sein -Poumon	-Anémie -Neuropathie -Cardiotoxicité
Etoposide (VP16) 100mg/5ml	Agent alkylant	0,2-04mg/ml	-Poumon -Testicules -Lymphome -Leucémie - Glioblastome	-Infection -Leucémie aigue secondaire -Leucopénie -Neutropénie -Thrombopénie

## II.2. Méthodes

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

Dans ce test, le modèle cellulaire utilisé est les globules rouges (GRs) humain sain, en raison de sa particularité constitutionnelle et fonctionnelle. Le sang a été obtenu au sein du centre de transfusion sanguine de la wilaya de Bejaïa et conservé au frais à 4C°.

Le sang a été réparti dans des tubes et centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Les plaquettes, les leucocytes et le plasma ont été soigneusement éliminés par pipetage, puis lavé 2 à 3 fois avec une solution isotonique (NaCl à 0,9%). La suspension érythrocytaire a été préparée à une hématocrite de 20%. (Mammeri et al., 2021).

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

Les solutions d'anticancéreux testées ont été préparées dans du NaCl à 0,9% à différentes concentrations (tableau IV).

**Tableau IV :** Concentrations utilisées des molécules anticancéreuses

La molécule	La concentration testée
Paclitaxel	0,6mg/ml
	0,3mg/ml
Etoposide	0,4mg/ml
	0,3mg/ml
	0,2mg/ml
	0,25mg/ml

### II.2.3. Préparation des solutions d'antioxydants

Les antioxydants utilisés sont la vitamine C et la vitamine E. La vitamine C a été préparée dans du NaCl à 0,9% à une concentration de 0,1 mg/ml. La vitamine E solubilisée dans la cyclodextrine a été préparée dans la solution isotonique à une concentration de 0,25 et 2 mg/ml.

### II.2.4. Etude de la cytotoxicité des antioxydants

Le principe de base de cette méthode consiste à traiter les globules rouges avec les différentes molécules antioxydants (vitamine C et vitamine E) préparées préalablement et de déterminer la concentration cellulaire, le taux de la méthémoglobine, le taux d'hémoglobine libérée et le taux d'hémoglobine intracellulaire par spectrophotométrie (figure 08), selon des protocoles décrits par (Caterina *et al.*, 1999), (Masahiko *et al.*, 2002), (Bellik *et al.*, 2016).

### II.2.5. Etude de la cytotoxicité des anticancéreux seuls ou combinés avec les antioxydants

#### II.2.5.1. Test de turbidité cellulaire

Les échantillons à analyser ont été préparés à partir du sang isotonique à 20% d'hématocrite et ils ont été répartis comme suit :

- Le tube témoin négatif contient un volume (ul) de sang isotonique avec un autre volume de la solution isotonique.
- Les tubes témoins positifs contiennent un volume (ul) du sang isotonique avec un volume de la solution isotonique.
- Test cytoprotecteur contient un volume (µl) de sang isotonique avec un volume de l'antioxydant.

Les érythrocytes sont ensuite incubés à 37°C pendant 30 min. Puis un volume de l'anticancéreux (PXT ou VP16) est ajouté pour chaque tube à l'exception du témoin négatif. L'incubation est poursuivie à 37°C pendant 2 h.

Après incubation, un volume du mélange y est prélevé puis dilué dans la solution isotonique.

L'absorbance de différents échantillons a été mesurée à 620 nm afin de déterminer la concentration cellulaire (Bellik *et al.*, 2016).

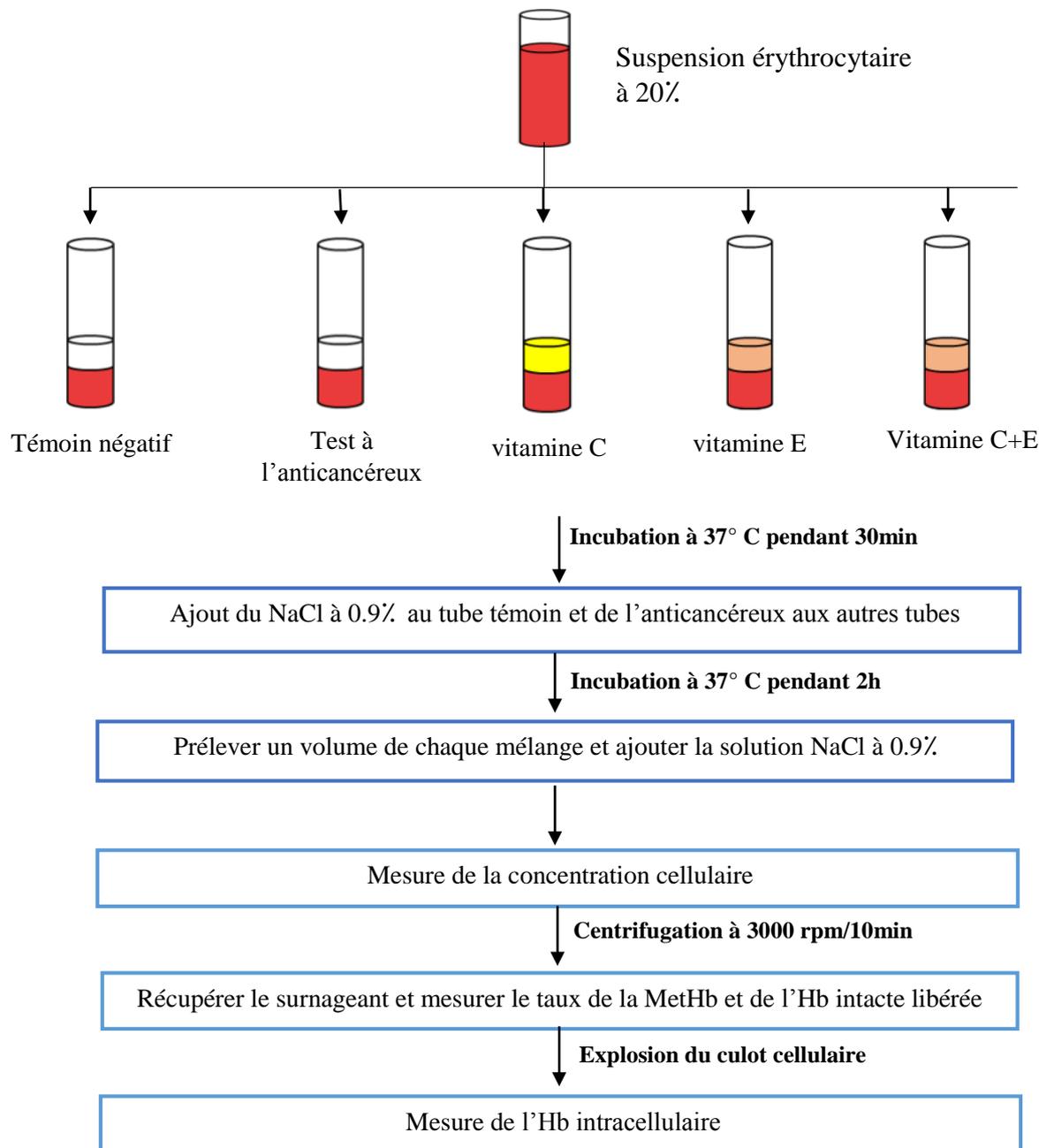
#### **II.2.5.2. Dosage de la méthémoglobine et de l'hémoglobine libérée**

Le taux de MetHb et de l'Hb libérée a été évalué pour les mêmes échantillons par spectrophotométrie après centrifugation à 3000 rpm en mesurant l'absorbance des surnageants par spectrophotomètre à 412nm et 540nm respectivement (Zheng *et al.*, 2016).

#### **II.2.5.3. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire**

Le culot cellulaire contenant des GRs intactes, est complètement lysé afin de libérer l'hémoglobine intracellulaire après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min. Les absorbances des surnageant ont été mesurées par spectrophotométrie (Oprea *et al.*, 2007).

La figure (08) illustre le protocole expérimental utilisé dans l'étude de l'effet cytoprotecteur des antioxydants combinés avec les molécules de chimiothérapie.



**Figure 08:** Protocole expérimentale de l'effet cytoprotecteur de la vitamine C et de la vitamine E contre le stress oxydant induit par les anticancéreux (Ma *et al.*, 2014 ;Bellik et Iguer-Ouada,2015 ;Zheng *et al.*,2016).

### II.2.6. Analyse statistique

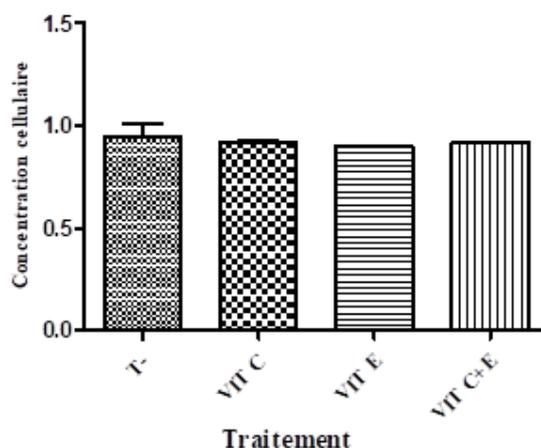
L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism 5, les résultats sont présentés comme moyenne  $\pm$  Ecart type (n=3). Les valeurs sont données en \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001(ou bien en # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001). Le test ANOVA One-Way a été utilisé pour comparer la différence entre chaque groupe traité avec les anticancéreux sélectionnés. Les valeurs de p<0,05 ont été considérées comme significatives.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

### III.1. Etude de la cytotoxicité des vitamines C et E sur le globule rouge

Afin de vérifier l'innocuité de la vitamine C et E sur les globules rouges, nous avons mesuré la concentration des cellules après traitement avec les vitamines. Les résultats montrent clairement que le prétraitement par les vitamines C et E ainsi que leur combinaison ne présentent aucun effet cytotoxique sur les GRs et la concentration cellulaire reste inchangée ( $0,915 \pm 0,007$ ) en comparant au témoin négatif ( $0,945 \pm 0,069$ ) (figure 09).



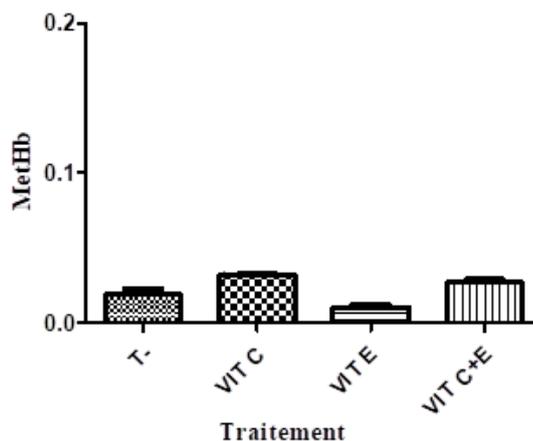
**Figure 09: Concentration cellulaire après traitement par la vit C (0,1 mg/ml), la vit E (0,25 mg/ml) et par la combinaison vit C+E.** T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M (n = 3).

D'après ces résultats, nous constatant que les vitamines C et E peuvent être utilisées comme un prétraitement en toute sécurité et ne cause aucune cytotoxicité sur le globule rouge.

### III.1.2. Etude de l'effet des vitamines C et E sur l'hémoglobine

#### III.1.2.1. Taux de la méthémoglobine générée

La méthémoglobine constitue un marqueur de tolérance du stress oxydatif dans les érythrocytes (Ayako *et al.*, 2007). Dans le but de vérifier l'impact des vitamines C et E sur l'oxydation de l'hémoglobine, nous avons mesuré le taux de méthémoglobine libéré après traitement avec les vitamines. Les résultats montrent une légère augmentation du taux de la MetHb générée lors du traitement avec la vitamine C ( $0,036 \pm 0,004$ ), ainsi que la combinaison de la vit E et vit C, par contre le traitement par la vitamine E montre une diminution significative du taux de la MetHb ( $0,013 \pm 0,004$ ) en comparaison avec le témoin négatif ( $0,019 \pm 0,004$ ) (figure10).

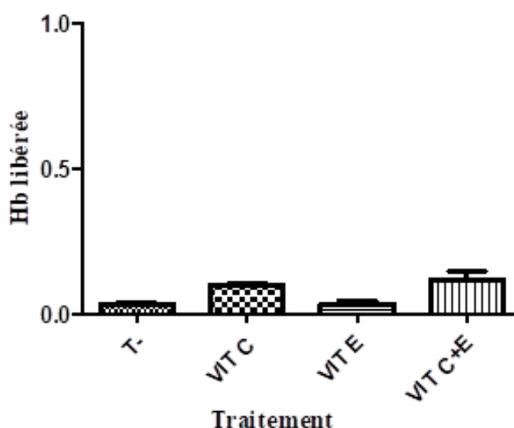


**Figure 10: Taux de MetHb générée après traitement avec la vitamine C (0,1mg /ml), la vitamine E (0,25 mg/ml) et par la combinaison vit C + vit E.** T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 3).

On constat que le contact direct des vitamines C et E ainsi que leur combinaison avec l'hémoglobine n'exercent pas d'effet cytotoxique.

### III.1.2.2. Taux de l'hémoglobine libérée

Les résultats exprimés dans la figure (11) montrent une légère libération de l'Hb après traitement avec la vitamine C ( $0,099 \pm 0,004$ ) comme aussi nous avons noté un taux significatif de l'Hb libérée après traitement par la vitamine C combinée avec la vitamine E ( $0,117 \pm 0,028$ ). Par contre, nous n'avons observé aucun changement dans le taux de l'Hb libérée après traitement avec la vitamine E ( $0,034 \pm 0,006$ ) en comparant au témoin négatif ( $0,033 \pm 0,006$ ).

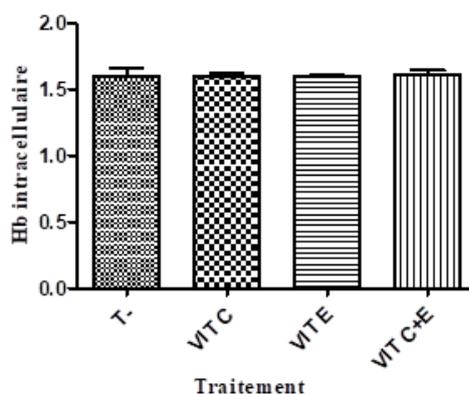


**Figure11 : Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec la vitamine C (0,1 mg/ml), la vitamine E (0,25 mg/ml) et par la combinaison vit C + E.** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 3).

Ces résultats confirment l'effet antioxydant et l'effet cytoprotecteur des vitamines C(0,1) et vitamine E (0,25) sur l'hémoglobine.

### III.1.2.3. Taux de l'hémoglobine intracellulaire

Les résultats de l'Hb intracellulaire montrent que les différents traitements des globules rouges (Vit C, Vit E et Vit C + Vit E) n'exercent aucun effet cytotoxique à l'égard de ces cellules qui se traduit par des taux élevés en Hb intracellulaire qui sont respectivement de (1,602±0,025 ; 1,59±0,015 et 1,52 ±0,094), aucune différence statistique n'a été observée. (figure 12).

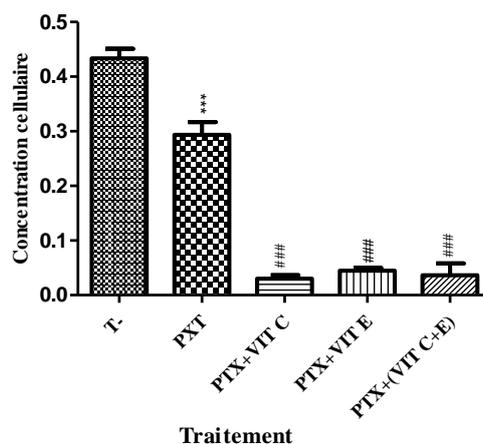


**Figure 12: Quantité de d'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml) et par la combinaison vit C + E.** Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 3). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001, comparé avec le contrôle négatif.

Cette étude confirme l'effet non toxique des vitamines E, C ainsi que leur combinaison sur les globules rouges via la mesure du taux de l'hémoglobine libérée et intracellulaire et le taux de la méthémoglobine. Des études antérieures ont été réalisées sur la vitamine C et il a été démontré que cette vitamine protège la membrane érythrocytaire (Taiwo et al., 2020).

### III.2.1. Effet de la vitamine C et de la vitamine E combiné aux paclitaxel sur le globule rouge

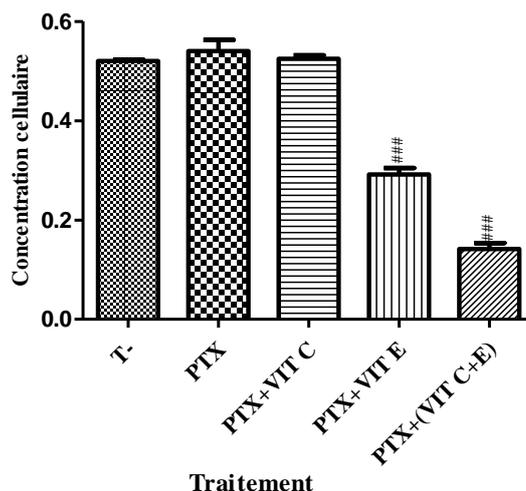
Les résultats de la concentration cellulaire montrent que le paclitaxel exerce un effet cytotoxique très significatif sur le globule rouge avec un taux de (0,293±0,023) en comparaison avec le témoin négatif (0,433±0,018). Comme nous avons noté une forte diminution de la turbidité cellulaire après prétraitement avec la vitamine C (0,03±0,006), la vitamine E (0,046±0,006) ainsi qu'avec la combinaison vitamine C+E (0,036±0,022), combiné au paclitaxel (figure 13).



**Figure 13: Concentration cellulaire après traitement par le paclitaxel (0,6mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,6mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E . # : comparaison avec l'anticancéreux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001).

Les résultats de la toxicité des érythrocytes après traitement par le PXT (0,6mg/ml) combiné à la vitamine C (0,1 mg/ml) (figure 11), révèlent que la vitamine C augmente l'effet cytotoxique du paclitaxel. En effet, il a été démontré que la vitamine C stimule la production des ERO qui sont fortement impliqués dans l'altération des membranes érythrocytaires (**Shi et al., 2018**). Des études antérieures ont démontré que la vitamine E exerce un effet synergique avec le MTX contre la cellule cancéreuse (**Yiang, 2021**). Dans cette étude nous avons démontré que le prétraitement des GRs avec la vitamine E accentue l'effet du PTX, ceci est probablement expliqué par la nature chimique lipophile des deux molécules. Nos résultats montrent aussi que lors du prétraitement avec la vitamine C et E combinée, l'effet cytotoxique du PTX augmente significativement. Les vitamines C et E renforcent la toxicité du PTX via un mécanisme de synergie.

Cet effet synergique a été confirmé en utilisant des concentrations faibles en PTX (0,3 mg/ml). Les résultats montrent que la vitamine E (0,292±0,013) ainsi que l'association vitamine E + C (0,142±0,012) diminuent significativement la concentration cellulaire (figure 14).



**Figure 14: Concentration cellulaire après traitement par le paclitaxel (0,3mg/ml) et la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,3mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E . # : comparaison avec l'anticancéreux. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Les valeurs de la turbidité cellulaires montrent que le paclitaxel à 0,3mg/ml n'a pas induit une diminution de la concentration cellulaire en comparant au témoin négatif. Aussi, nous avons noté que le prétraitement par la vitamine C (0,1mg/ml) combiné au PXT (0,3mg/ml) n'a pas d'effet cytotoxique sur les GRs. Par contre, le prétraitement par la vitamine E (0,25mg/ml) combiné au PXT induit un potentiel effet cytotoxique ( $0,292 \pm 0,013$ ). En outre, la combinaison de la vitamine C+E présente un effet cytotoxique hautement significatif ( $0,142 \pm 0,012$ ). Nous pouvons admettre que la vitamine C n'exerce pas d'effet synergique avec le PXT à faible concentration, contrairement à la vitamine E, qui possède un effet additif avec le PTX.

La combinaison de la vitamine C et E potentialise la toxicité du PXT, cet effet est peut-être dû à la régénération de la vitamine E par la vitamine C au niveau membranaire (**Carita et al., 2020**).

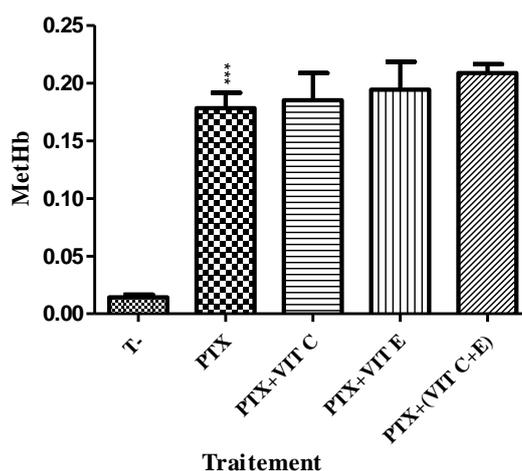
Dans une étude récente, il a été démontré qu'il existe une forte interaction entre la vitamine E et le PTX, les micelles à base de vitamine E encapsulent le PTX et exerce ainsi une forte activité anti-tumorale (**Ma et al., 2021**). Par conséquent, les résultats obtenus dans notre étude peuvent être expliqués par le fait que la vitamine E interagit avec la membrane érythrocytaire ce qui facilite ainsi l'action du PTX et induit des lésions irréversibles au niveau des GRs.

### III.2.2. Effet de la vitamine C et E combinées au paclitaxel sur l'hémoglobine

Pour mieux comprendre l'impact de la vitamine C et E sur l'hémoglobine, nous nous sommes intéressés à la mesure du taux de l'hémoglobine libérée et de la méthémoglobine générée lors du prétraitement par ces vitamines combinées au PTX.

#### III.2.2.1. Taux de la méthémoglobine générée

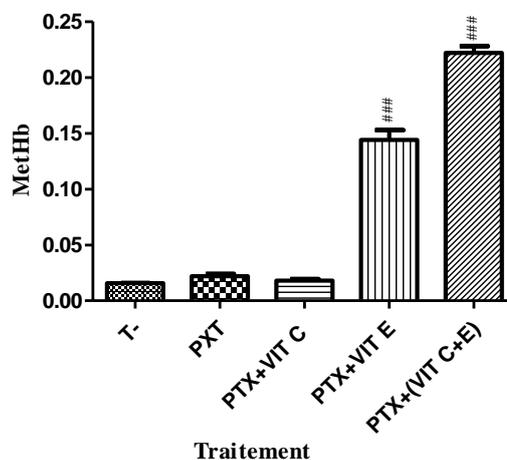
Le dosage de la MetHb est considéré comme une étape primordiale dans notre étude car, il constitue un marqueur clé du stress oxydant (Burak, 2008). Les résultats obtenus montrent que le PXT exerce un effet oxydant important sur l'hémoglobine qui est révélé par un taux de MetHb très significatif ( $0,178 \pm 0,013$ ) en comparaison avec le témoin négatif ( $0,014 \pm 0,004$ ). Le prétraitement par les vitamines C, E et leur association génère des taux très élevés en MetHb ( $0,186 \pm 0,024$ ;  $0,194 \pm 0,024$  et  $0,209 \pm 0,006$ , respectivement), aucune différence significative n'a été observée en comparant au PTX (figure 15).



**Figure 15 : Taux de méthémoglobine après traitement par le paclitaxel (0,6mg/ml) et la vitamine C (0,25mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,6mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E . # : comparaison avec l'anticancéreux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001).

D'après ces résultats nous constatons qu'il existe une forte corrélation entre la génération de la méthémoglobine et la diminution de la turbidité cellulaire lors du prétraitement par la vitamine C et E ainsi que leur combinaison. En effet, une diminution de la concentration cellulaire s'accompagne d'une augmentation du taux de la MetHb ce qui indique un stress oxydant puissant engendré sur les GRs traités.

D'après la (figure16), nous observons que le PTX seul à 0,3mg/ml n'exerce pas d'effet oxydant sur l'Hb ; par contre, le prétraitement des GRs avec la vitamine E (0,25 mg/ml) et avec la combinaison vitamine C+E génèrent des taux très significatifs en MetHb qui sont respectivement de (0,144±0,009) et de (0,222±0,006).



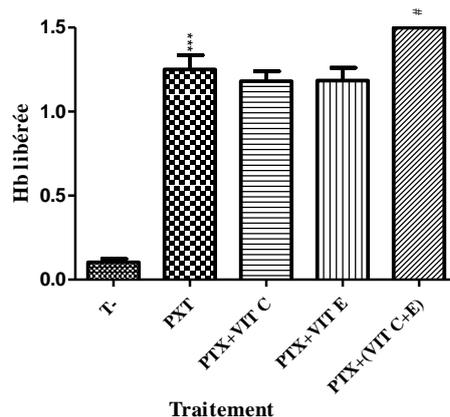
**Figure 16: Taux de méthémoglobine après traitement par le paclitaxel (0,3mg/ml) et la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,3mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E . # : comparaison avec l'anticancéreux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001).

La méthémoglobine constitue une forme oxydée d'hémoglobine qui fixe le fer à l'état ferreux (Burak, 2008), elle peut être générée avec des taux faibles lors du traitement par le PXT, en outre, le prétraitement par la vitamine E ainsi que sa combinaison à la vitamine C accentuent l'oxydation de l'hémoglobine.

### III.2.2.2. Taux de l'hémoglobine libérée

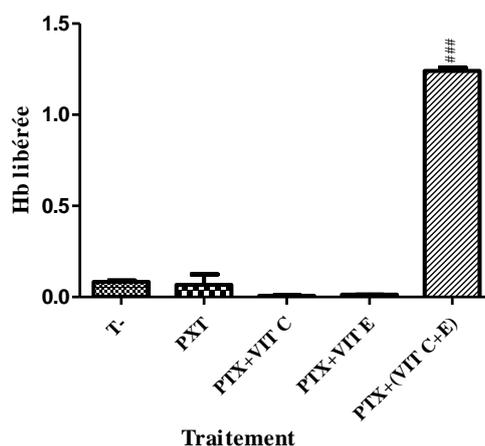
Les résultats montrent que les valeurs du dosage de l'hémoglobine libérée vont dans le sens opposé des concentrations cellulaires (figure17) après traitement par le PXT (1,155±0,108), la vitamine C (1,071±0,115) ainsi que par la vitamine E (1,276±0,102).

Nous avons aussi noté que le taux le plus élevé en Hb libérée a été obtenu après le prétraitement par l'association vitamine C et E (1,437±0,062). Ces résultats expliquent alors l'effet synergique des vitamines C et E avec le PXT, qui induit la lyse des GRs et par conséquent la libération de l'Hb intacte dans le milieu extracellulaire.



**Figure 17 : Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,6mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,6 mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. # : comparaison avec l'anticancéreux. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

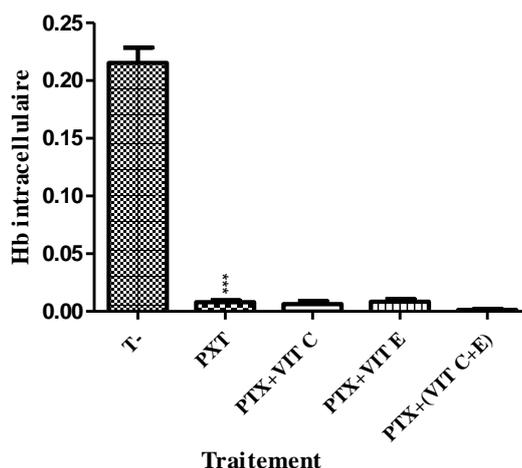
Les résultats du traitement des GRs avec le PXT à 0,3mg/ml, montrent clairement que cette molécule n'a pas induit la lyse des GRs qui se traduit par un taux très faible en Hb libérée (figure 18). Cependant, le prétraitement par la vitamine C et E combinées indique un effet hémolytique hautement significatif ( $P < 0,001$ ) avec un taux de  $(1,241 \pm 0,018)$ . Nous pouvons constater que les vitamines C et E combinées stimulent l'effet cytotoxique du paclitaxel.



**Figure 18: Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,3mg/ml) et par la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,3 mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

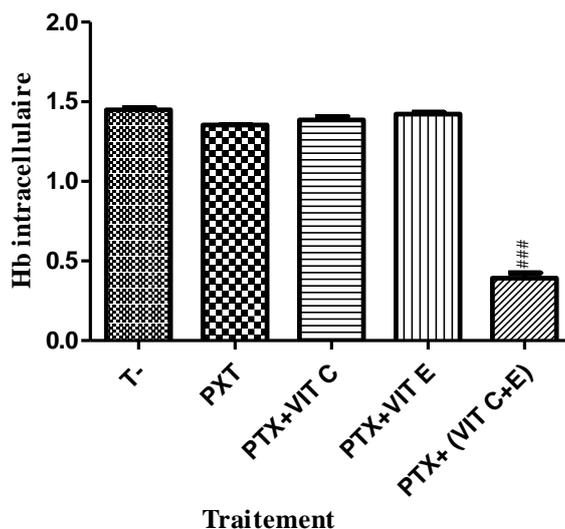
### III.2.2.3. Hémoglobine intracellulaire

Les valeurs du dosage de l'hémoglobine intracellulaire (figure 19) montrent que le prétraitement par le PXT, la vitamine C, et la vitamine E ainsi que leur combinaison présentent des taux très faibles en Hb intracellulaire ( $0,028 \pm 0,015$  ;  $0,037 \pm 0,012$  ;  $0,039 \pm 0,004$  ;  $0,01 \pm 0,008$  ; respectivement).



**Figure 19 : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,6mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,6 mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

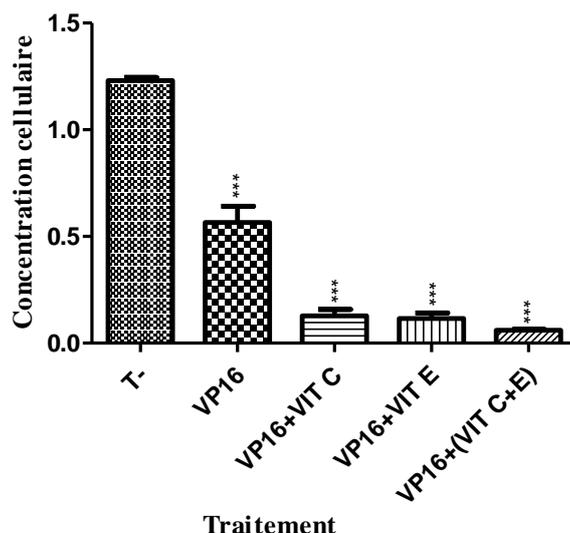
Les valeurs du dosage de l'hémoglobine intracellulaire (figure 20) montrent que le prétraitement par le PXT, la vitamine C et la vitamine E présentent des taux élevés en Hb intracellulaire qui sont respectivement de  $1,156 \pm 0,199$  ;  $1,386 \pm 0,021$  et  $1,423 \pm 0,01$ . Contrairement au prétraitement par la vitamine C et E combinées qui révèle une diminution significative ( $P < 0,001$ ) de l'Hb intracellulaire ( $0,393 \pm 0,033$ ). Ceci permet de déduire que l'association de la vitamine C et E avec le PXT à faible concentration altère l'intégrité membranaire et l'hémoglobine intracellulaire.



**Figure 20 : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec le paclitaxel (0,3mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** PXT : paclitaxel à 0,3 mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### III. 3.1. Effet de la vitamine C et la vitamine E combiné à l'etoposide sur le globule rouge

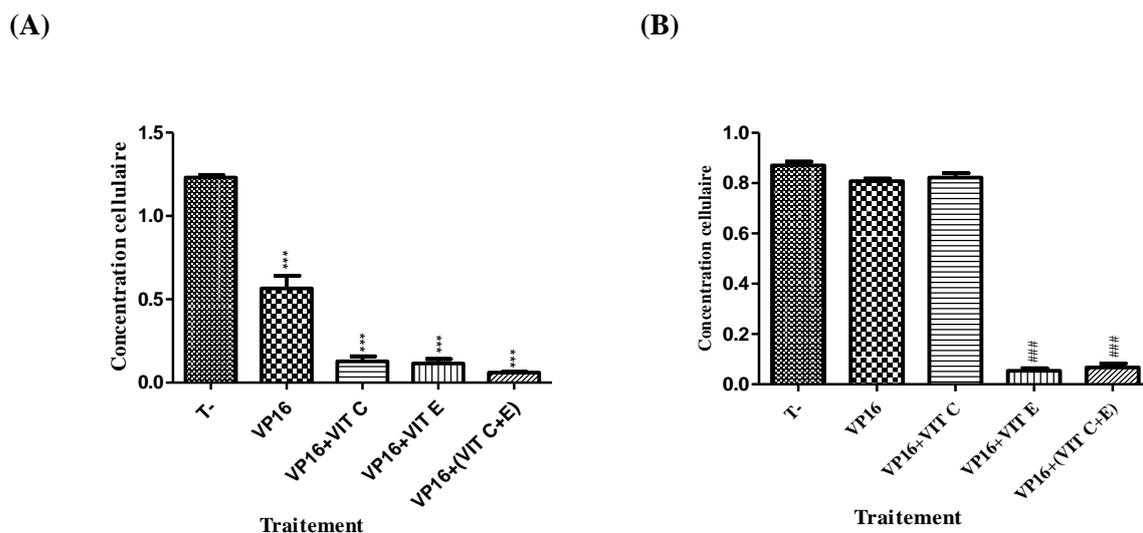
Les résultats de la concentration cellulaire montrent que l'etoposide (VP16) exerce un effet cytotoxique très significatif sur le globule rouge avec un taux de  $(0,566 \pm 0,076)$  En comparaison avec le témoin négatif  $(1,231 \pm 0,015)$ . Comme nous avons noté une forte diminution de la turbidité cellulaire après prétraitement avec la vitamine C  $(0,129 \pm 0,029)$ , la vitamine E  $(0,116 \pm 0,026)$  ainsi qu'avec la combinaison vitamine C+E  $(0,06 \pm 0,004)$ , combiné avec le VP16 (figure 21).



**Figure 21: Concentration cellulaire après traitement par l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** VP16 : Etoposide à 0,4mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ;vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Les résultats de la toxicité des érythrocytes après traitement par le VP16 (0,4mg/ml) combiné à la vitamine C (0,1 mg/ml), à la vitamine E à (0,25mg/ml), révèlent que les vitamines C et E augmentent l'effet cytotoxique de VP16. En effet il a été démontré que la vitamine C peut protéger les cellules des effets toxiques sans interférer à l'anticancéreux (**Parka, 2012**). Une autre étude a montré que la vitamine E peut jouer plusieurs rôles, parmi ces rôles, elle peut être un transporteur de molécules lipophiles (**Beig, 2017**). Il a été aussi démontré que la vitamine E, à faible concentration, peut inhiber l'effet de cisplatine mais elle augmente significativement l'effet du VP16 sur la cellule cancéreuse (**Kruspig et al., 2012**). Notre étude a montré que la vitamine E exerce un effet synergique avec le VP16 à (0,4mg/ml) et facilite sa pénétration dans le GR.

Pour confirmer le résultat de l'effet de la vitamine E combinée à l'etoposide sur le GR, nous avons augmenté la concentration de la vitamine E à 2mg/ml (figure 22). Les résultats montrent une diminution très significative du taux de la concentration cellulaire après prétraitement par les vitamines C ( $0,028 \pm 0,001$ ) et E ( $0,016 \pm 0,008$ ) en comparant au VP16. D'après ces résultats, nous constatons que même en augmentant la concentration de la vitamine E, cette dernière accentue l'effet oxydant du VP16.



**Figure 22: Concentration cellulaire après traitement par l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E(0,25mg/ml ; 2mg/ml).** (A) VP16 : Etoposide à 0,4mg/ml ; Vit E 0,25mg/ml, (B) VP16 à 0,2mg/ml et Vit E à 2mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001).

Les valeurs de la turbidité cellulaires (Figure 22B) montrent que l'etoposide à 0,2mg/ml n'a pas induit une diminution de la concentration cellulaire ( $0,808 \pm 0,01$ ) en comparant au témoin négatif ( $0,87 \pm 0,015$ ). Aussi, nous avons noté que le prétraitement par la vitamine C (0,1mg/ml) combiné au VP16 (0,2mg/ml) n'a pas d'effet cytotoxique sur les GRs. Par contre, le prétraitement par la vitamine E (2mg/ml) combiné au VP16 induit un potentiel effet cytotoxique ( $0,054 \pm 0,01$ ). En outre, la combinaison de la vitamine C+E présente un effet cytotoxique hautement significatif ( $0,067 \pm 0,016$ ). Nous pouvons admettre que la vitamine C n'exerce pas d'effet synergique avec le VP16 à faible concentration, contrairement à la vitamine E, qui possède un effet stimulateur avec le VP16.

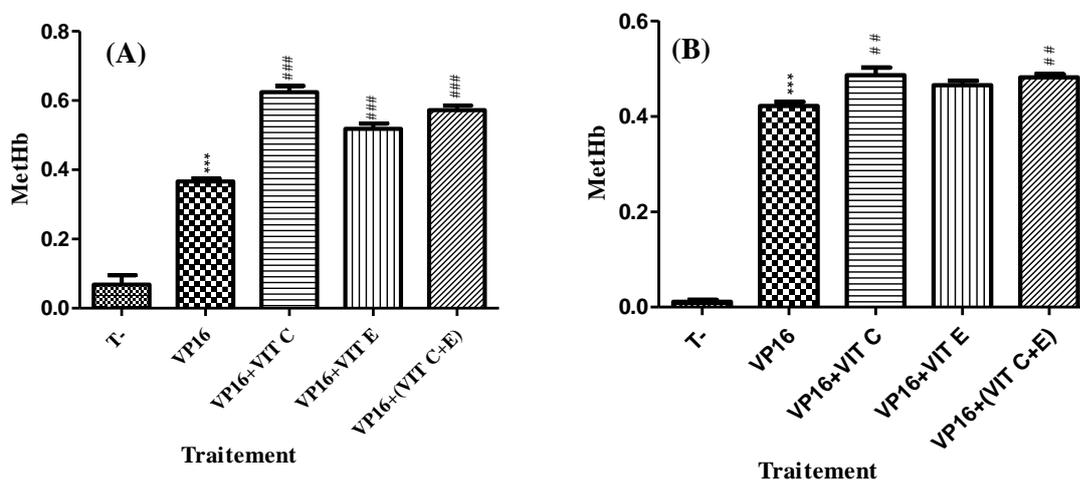
### III.3.2. Etude de l'effet des vitamines C et E combinés à l'etoposide sur l'hémoglobine

Pour mieux comprendre l'impact de la vitamine C et E sur l'hémoglobine, nous nous sommes intéressés à la mesure du taux de l'hémoglobine libérée et de la méthémoglobine générée lors du prétraitement par ces vitamines combinées au VP16.

#### III.3.2.1. Taux de la méthémoglobine générée

Le dosage de la MetHb est considéré comme une étape primordiale dans notre étude car, il constitue un marqueur clé du stress oxydant (Burak, 2008). Les résultats obtenus

montrent que le VP16 exerce un effet oxydant important sur l'hémoglobine qui est révélé par un taux de MetHb très significatif ( $0,296 \pm 0,068$ ) en comparaison avec le témoin négatif ( $0,096 \pm 0,033$ ). Le prétraitement par les vitamines C, E et leur association génère des taux très élevés en MetHb ( $0,624 \pm 0,018$ ;  $0,518 \pm 0,015$  et  $0,572 \pm 0,013$  ; respectivement) (figure 23 A).



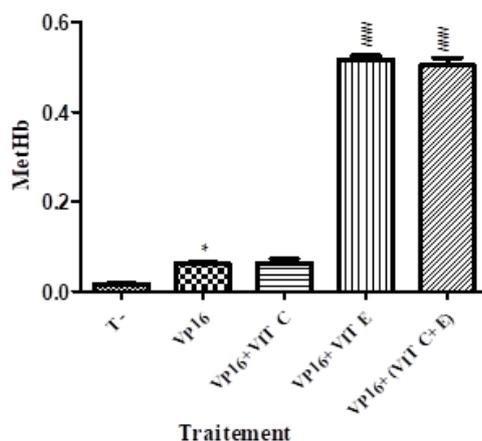
**Figure 23 : Taux de méthémoglobine après traitement par l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml ; 2mg/ml).**

(A) VP16 : Etoposide à 0,4mg/ml ; Vit E 0,25mg/ml, (B) VP16 à 0,4mg/ml et Vit E à 2mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Les résultats de la figure 23B montrent que le prétraitement par les vitamines C (0,1mg/ml) et E (2mg/ml) combinées au VP16 (0,4mg/ml) induit une libération de quantités importantes de la MetHb ( $0,422 \pm 0,09$ ). En effet, les résultats sont plus significatifs pour le prétraitement par la vitamine C ainsi que pour la vitamine C et E combinées ( $0,486 \pm 0,016$  et  $0,482 \pm 0,006$ , respectivement).

Pour mieux comprendre l'effet de l'etoposide sur l'hémoglobine nous avons diminué sa concentration à (0,2 mg/ml).

D'après la figure 24, nous constatons que le VP16 seul à 0,2mg/ml n'exerce pas d'effet oxydant sur l'Hb ; par contre, le prétraitement des GRs avec la vitamine E (2 mg/ml) et avec la combinaison de vitamine C et E génèrent des taux très significatifs en MetHb qui sont respectivement de  $0,516 \pm 0,009$  et de  $0,503 \pm 0,016$ . Cela, nous laisse suggérer que la vitamine E facilite l'oxydation de l'hémoglobine par le VP16.



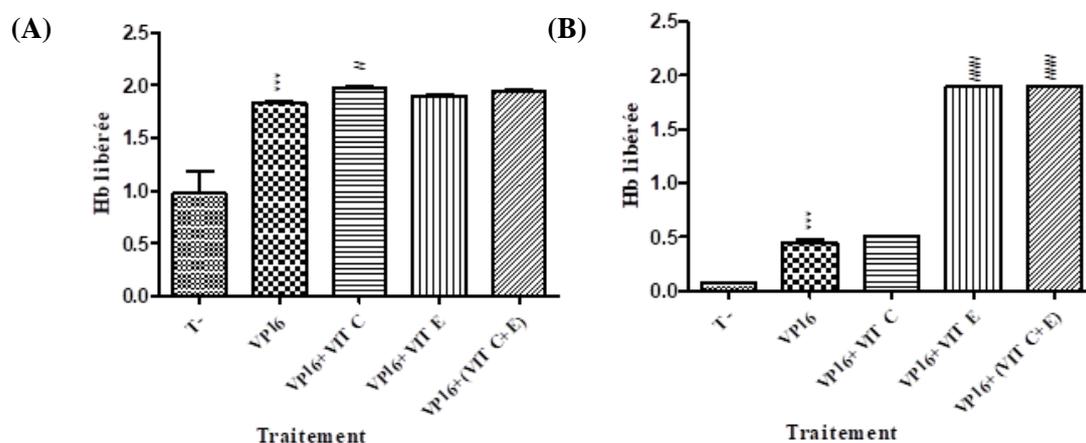
**Figure 24 : Taux de méthémoglobine après traitement par l'etoposide (0,2mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (2mg/ml).** VP16 : etoposide à 0,2mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%) ; vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 2mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### III.3.2.2. Taux de l'hémoglobine libérée

Les résultats montrent que les valeurs du dosage de l'hémoglobine libérée vont dans le sens opposé des concentrations cellulaires (figure 25A) après traitement par le VP16 ( $1,631 \pm 0,203$ ), la vitamine C ( $1,981 \pm 0,006$ ) ainsi que par la vitamine E ( $1,89 \pm 0,007$ ).

Nous avons aussi noté que le taux le plus élevé en Hb libérée a été obtenu après le prétraitement par la vitamine C ( $1,981 \pm 0,006$ ). Ces résultats expliquent alors l'effet synergique des vitamines C et E avec le VP16 qui induisent la lyse des GRs et par conséquent la libération de l'Hb intacte dans le milieu extracellulaire.

Les résultats du traitement des GRs avec le VP16 à 0,2mg/ml, montrent clairement que cette molécule n'a pas induit la lyse des GRs qui se traduit par un taux faible en Hb libérée (figure 25B). Cependant, le prétraitement par la vitamine C combiné au VP16 révèle un résultat similaire au traitement par le VP16 seul. Le traitement par la vitamine E à 2mg/ml ainsi que son association à la vitamine C combiné avec le VP16 indique un effet hémolytique hautement significatif ( $P < 0,001$ ) avec des taux respectifs de  $1,904 \pm 0,003$  et de  $1,896 \pm 0,007$ . Nous pouvons déduire que l'effet hémolytique est dû principalement à la vitamine E qui stimule l'effet cytotoxique du VP16.

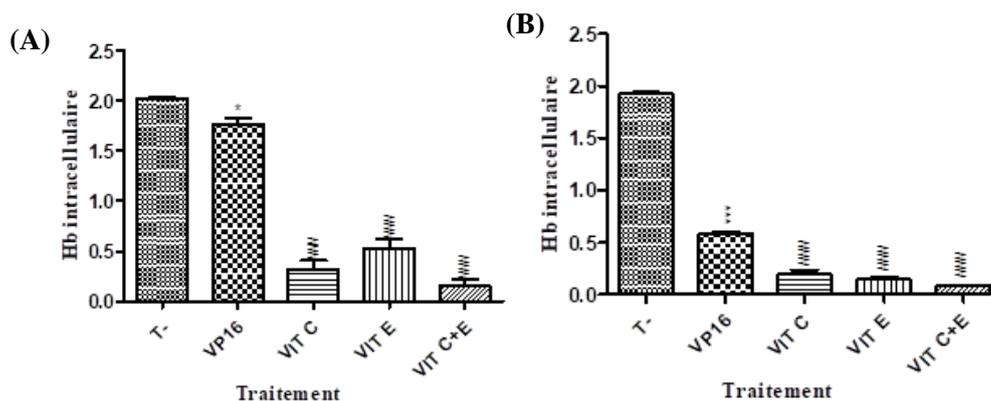


**Figure 25: Quantité de l'hémoglobine libérée à partir des globules rouges traités avec l'etoposide (0,4mg/ml ; 0,2mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml).** (A) VP16 : Etoposide à 0,4 mg/ml, (B) VP16 à 0,2mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### III.3.2.3. Hémoglobine intracellulaire

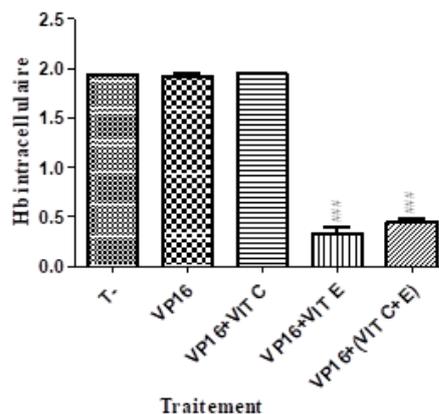
Les valeurs du dosage de l'hémoglobine intracellulaire (figure 26A) montrent que le prétraitement par le VP16 présente un taux très élevé en Hb intracellulaire ( $1,770 \pm 0,052$ ). Contrairement au prétraitement par la vitamine C, la vitamine E ainsi que leur combinaison qui présentent des taux très faible en Hb intracellulaire ( $0,324 \pm 0,087$ ;  $0,527 \pm 0,089$  ;  $0,155 \pm 0,068$  ; respectivement). Cela, permet de déduire que l'association de la vitamine C et E avec le VP16 altère l'hémoglobine intracellulaire.

Après avoir augmenté la concentration de la vitamine E à 2mg/ml (figure 26B), nous avons enregistré des résultats presque similaires aux résultats du traitement avec la vitamine E à 0,25mg/ml, ce qui confirme l'effet cytotoxique de la vitamine E combiné au VP16 sur l'Hb intracellulaire.



**Figure 26 : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec l'etoposide (0,4mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (0,25mg/ml ; 2mg/ml).** (A) VP16 : etoposide à 0,4 mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml ; (B) VP16 à 0,4 mg/ml, vit E à 2mg/ml ; T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Les résultats illustrés dans la (figure 27) montrent que le traitement par le VP16 et le prétraitement par la vitamine C présentent des taux élevés d'hémoglobine intracellulaire qui sont respectivement de  $1,927 \pm 0,024$  et de  $1,950 \pm 0,007$ . Contrairement au prétraitement par la vitamine E ainsi que sa combinaison à la vitamine C qui révèlent une diminution significative de l'Hb intracellulaire avec des taux très faibles :  $0,332 \pm 0,07$  et  $0,449 \pm 0,03$  ; respectivement.



**Figure 27 : Quantité de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités avec l'etoposide (0,2mg/ml) et par la vitamine C (0,1mg/ml), la vitamine E (2mg/ml).** VP16 : etoposide à 0,2 mg/ml, T- : témoin négatif (NaCl à 0,9%); vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 2mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (#  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$ ). \* : comparaison des tubes traités avec le T-. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des différentes expérimentations (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## **Conclusion**

## Conclusion

L'objectif principal de ce travail consiste à étudier l'effet protecteur des antioxydants à savoir la vit C et vit E (seules ou combinées) sur les globules rouges humains, sous conditions de stress oxydant induit par les anticancéreux (PTX et VP16) utilisés de nos jours dans la chimiothérapie.

Notre approche expérimentale a d'abord consisté à évaluer la cytotoxicité membranaire induite par des agents de chimiothérapie sur le modèle cellulaire (GR) et ensuite d'étudier l'effet protecteur des antioxydants (C et E) à l'égard de la toxicité induite par les agents anticancéreux. Pour explorer le mécanisme d'action des vitamines E et C sur l'oxydation d'hémoglobine, nous avons mesuré le taux de la méthémoglobine générée qui constitue un marqueur important du stress oxydant.

Au terme de notre travail, nous pouvons conclure que les molécules chimiothérapiques agissent différemment d'un agent à un autre en dépendant de la molécule utilisée, la dose et de sa nature chimique. Les résultats ont montré que les vitamines C et E, notamment la vitamine E peuvent exercer un effet synergique ou stimulateur avec certaines molécules anticancéreuses, de nature lipophile à savoir le PXT et le VP16, plutôt qu'un effet protecteur des GRs.

Cette étude nous a éclaircie le mécanisme de synergie de la vit C et vit E avec le paclitaxel et l'etoposide sur l'altération des globules rouges, cependant il est intéressant d'étudier d'autres molécules anticancéreuses de différentes natures chimiques que celles que nous avons utilisées afin d'explorer d'autres mécanismes de toxicité synergique sur les erythrocytes, et d'investiguer s'il existe un effet cytoprotecteur lors du prétraitement par les vitamines C et E combinés à d'autres anticancéreux de nature non lipophile. Il serait donc intéressant d'élargir cette étude en augmentant la gamme d'antioxydants et aussi étudier leur effet notamment sur la machinerie enzymatique antioxydante des GRs telle que : le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase.

## **Références bibliographiques**

- Abotaleba, M., Kubatkab, P., Caprnda, M., Varghesea, E., Zolakovac, B., Zubore, P., Opatrilovaf, R., Kruzliakg, P., Stefanickai, P., Dietrich, B.** (2018). Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 458–477.
- Ackland, S.P.** (2000). Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolite. *Pharmacology & therapeutic*, 87, 227-253.
- Agnieszka, B., Joanna, C.H., Agata, C., Dabrowski, M., Sikora, E.** (2019). Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. *Cells*, 8, 1501.
- Ajila, C.M., Prasada Rao, U.J.S.** (2008). Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 303-309.
- Alfadda, A.A., Sallam, R. M.** (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*, 93, 64-86.
- Akhlaghi1, E., Rebecca, H., Lehto1., Torabikhah, M., Sharif Nia, H., Taheri, A., Zaboli, E., Yaghoobzadeh, A.,** (2020). Chemotherapy use and quality of life in cancer patients at the end of life. *Heath Qual Life Outcomes*, 18, 332.
- Amanda, C., Caritá, M.Da., Bruno, F.S., Shultz, J.D., Michniak-Kohn, B., Chorilli, M., Gislaine, R.L.** (2019). Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomedicine*. 1-15.
- Ayako, K., Yoichi, N., Tomoya, K., Masaru, T.** (2007). Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *Federation of European Biochemical Societies*, 274, 1449–1458.
- Azzi, A.** (2007). Molecular mechanism of  $\alpha$ -tocopherol action. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 16-21.
- Bardyn, M., Tissot, J.D., Prudent, M.** (2018). Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. *Transfusion Clinique et Biologique*, 25, 96-100.
- Baudin, B.** (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 522, 22-30.
- Belkhiri, F., Bahgiani, A.** (2017). Plantes médicinales : Activités antioxydantes et antibactériennes. *Edition universitaire européen*, p128.
- Björn, k.a, Boris, Z., Vladimir, G.** (2012). Contrasting effects of  $\alpha$ -tocopheryl succinate on cisplatin- and etoposide-induced apoptosis. *Mitochondrion*. 1-6.
- Blokhino, O., Virolainem, E., Fargestdt, K.V.** (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *a review. Annals of Botany*, 91, 179-194.

- Bossokpi, I.P.L.** (2002). Etude des activités biologiques de Fagara xanthoxyloïdes Lam (Rutaceae). Thèse de doctorat en pharmacie, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie, *Université de Bamako*, p09.
- Bryer, E., Henry, D.** (2018). Chemotherapy-induced anemia: etiology, pathophysiology, and implications for contemporary practice. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine*, 6, 21-31.
- Casciato, D.A., Territo, M.C.** (2009). Manual of clinical oncology lippincott Williams. *Sixth Edition*, p794.
- Causse C.** (2005). Les secrets de sante des antioxydants. *Edition Alpen S.a.m. Paris*. 95.
- Christine, C., Winterbourn.** (1985). Free-Radical Production and Oxidative Reactions of Hemoglobin. *Environmental Health Perspectives*, 64, 321-330.
- Çimen, B.** (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes, *Clinica Chimica Acta*, 390, 1–11.
- Claro, M.L., Suely Soares Leonart, M., Ricardo Comar, S., Aguiñaldo, J.N.** (2005). Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. *Cell Biochem Funct*, 24,531–535.
- Cooke, M.S., Evans, M., Dizdaroglu, D, M., Lunec, J.** (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease Review article, 17, 1195-214.
- Crawford, J., Dale, D.C., Lyman, G.H.** (2004). Chemotherapy-induced neutropenia: risks, consequences, and new directions for its management. *Cancer review article*, 100, 228-37.
- Cruz Silvaa, M.M., Madeirab, V.M.C., Almeidaa, L.M., Custó'dio.** (2011). Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocytes membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicology in Vitro*, 15, 615–622.
- Daniel, F., Hayes. Anne, F., Schott.** (2015). Neoadjuvant Chemotherapy: What Are the Benefits for the Patient and for the Investigator? *Journal of the National Cancer Institute Monographs*.51.
- Defraigne, J.O., Degrune, F., Malherbe, C., Paquot, N., Pincemail, J., Voussure, S.** (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21, 66-75.
- Diallo A.,** (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense*. *WILLD (MYRTACEAE)*. Thèse de doctorat en pharmacie. *Univercité de Bamako*, 13-14.
- Dragony, F., Jennifer, A., Calvo., Leona, D., Samson.** (2012).Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Cancer reviews*.12.

- Durand, D., Damon, M., Gobert, M.** (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente:Principes généraux. *Cahiers de nutrition ET de diététique*, 48, 218-224.
- Eima, M., Vapar, M.A., Mukhtar, H.** (2014). Targting microtubules by natural agents for cancer. *Molecular cancer therapeutic*, 16.
- Emilia, A., Perez, R., Bhol, N., Rama., Muktam, W.** (1986). Vitamin E enhances the chemotherapeutic effect of Adriamycin on human prostatic carcinoma cell *in vitro*.*The journal of urologie*,136, 529-531.
- Espinosa, E., Pilor, Z., Feliu, J., Gonzalez, M.B.** (2003). Classification of anticancer drugs a new system based on therapeutic target. *Cancer treatment reviews*, 29,515-523.
- Fain, O.** (2004). Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne*, 12 25,872–880.
- Faridi, U., Alatawi, F., Mostafa, M.** (2017). Protective role of tocopherol and ascorbic acid in taxol-treated human erythrocytes *in vitro*. *Toxicology Research and Application*, 1, 23978473.
- Favier, A.** (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.17705813.
- Fernanda, C., Campos, A., Vanessa, J., Victorino, B., Marli, C., Martins-Pinge, C., Alessandra, L., Panis, C., Cecchini, R.** (2014). Systemic toxicity induced by paclitaxel in vivo is associated with the solvent cremophor EL through oxidative stress-driven mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 78-86.
- Fuchs-Tarlovsky, V.** (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, 29, 15-21.
- Gamaleldin, I., Harisa, A.B., Mohamed, F., Ibrahim, A., Alanazi, F., Gamal, A., Shazly.** (2013). Engineering erythrocytes as a novel carrier for the targeted delivery of the anticancer drug paclitaxel. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 1-8.
- Gascard, P., Choquet, S., Mohandas, N.** (2000). Protéine 4.1: la famille s' agrandit. *Hématologie*, 5(6), 439-46.
- Giou, T.Y., Tsu-Yi, C., Cian, C., Yu-Ting, H., Kuan, C.** (2021). Antioxidant vitamins promote anticancer effects on low-concentration methotrexate-treated glioblastoma cells via enhancing the caspase-3 death pathway. *Food Sci Nutr*, 9, 3308–3316.
- Gregory M.T. Hare, A.B.N., Albert, K.Y., Tsui, A., Jack, H., Crawford, C., Rakesh, P., Patel.** (2012). is methemoglobin an inert bystander, biomarker or a mediator of oxidative stress—the example of anemia? *Redox Biology*, 65-69.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC.** (2007). Free radicals in biologie and medicine. Oxford University press (fourth edition) ,01, 01.

- Iqbal, A., Syed, M.A., Haque, M. M., Najmi, A. K., Ali, J., Haque, S. E.** (2020). Effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced bone marrow and hematologic toxicity in Swiss albino mice. *Experimental Hematology*, 82, 24-32.
- Javier, C., Jose, B.** (2007). targeting the microtubules in breaste cancer beyond taxanes. *The epothilones molecular cancer therapeutique*, 12, 271-280.
- Jin-Hee, P., Keith, R., Davis, C., Gunsup, L., Manyong, J., Yuchul, J., Jungan, P., Sang-Yeop, Y., Myung-Ah, L., Sukchan, L., Chang-Hwan, Y., Jin, K.** (2012). Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice, *Nutrition Research*, 11, 873-883.
- Kanchana, K.G., Kishori1, P. S.** (2013). Cisplatin and/or etoposide induces oxidative stress in testicular, hepatic and kidney tissues in male albino mice. *J Biol Earth Sci*, 2, 249-254.
- Kanchanlata, S., Bhuri, M., Arfat, Y.K., Ganapathi, B., Thankamani, M.** (2017). Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 1-14.
- Kaya1, E., Keskin, I., Aydogdui, I., kukul, N., Bayraktar, M.A., Erkuti.** (2005). Oxidant/antioxidant Parameters andtheir Relationship with Chemotherapy in Hodgkin’s Lymphoma. *The Journal of International Medical Research*, 33, 687 – 692.
- Kenneth, K., Marshall, A., Lichtman, Josef, T., Prchal., Marcel, L., Oliver, W., Press, Linda, J., Burns., Michael, A.** (2016). Hematology. New York : Ninth Edition ed, McGraw-Hill Medical.
- Kimberly, S., Bernard, J., Fisher, Fowler, E., Alpha, A., Ramesh, N.** (2017). Attenuation of Red Blood Cell Storage Lesions with Vitamin C. *Antioxydants*, 6, 55.
- Klener, P., Alexander, M. S., Cullen, J. J., Stejskal, V., Slíva, J., Kotlářová, L., Kučerová, M.** (2020). The benefits of ascorbate to protect healthy cells in the prevention and treatment of oncological diseases. *Journal of Applied Biomedicine*, 18, 1-7.
- Klichkhanova, N.K., Ismailovaa, Zh.G., Astaevaa, M.D., Chalabova, Sh.I.** (2019). Effects of Vitamins C and E on Free Radical Processes in the Blood of Rats in Acute Moderate Hypothermia. *Seriya Biologicheskaya*, 6, 577–585.
- Klimczak, I., Szlochta, M., Gliszczyns, K.A.** (2007). Effect Storage on the content of polyphenols vitamin C and antyoxoydant activity of orange juice. *Food Comp Anal*, 20, 313-322.
- Krukiewicz, K., Jerzy, K., Zak.** (2016). Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects. *Materials Science & Engineering C*, 1-57.
- Li, F., Miao, Wang, S., Liu, Q., Wang, Y., Sun, J.** (2017). Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*, 15.

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P.** (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 13,757-772.
- Malarkodi, K.P., Sivaprasad, R., Varalakshmi, P.** (2004). Effect of lipoic acid on the oxido reductive status of red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin. *Human & Experimental Toxicology*, 23,129 -135.
- Mameri, A., Bournine, L., Mouni L., Bensalem, S., Iguer-Ouada, M.** (2021). Oxidative stress as an underlying mechanism of anticancer drugs cytotoxicity on human red blood cells membrane. *Toxicity in vitro*, 72, 105-106.
- Mansouri, A., Aubrey, A., Lurie.** (1993). Methemoglobinemia. *American Journal of Hematology*, 42:7-12.
- Ma, Yang, Y., Lu, J., Wang, L., Ren, X.J., Yang, J.** (2017). Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863, 1904-1911.
- Michael, C., Mackey1, Glisovic, S., Leclerc, J.M., Pastore, Y., Krajcinovic, M., Morgan, C.** (2020). The timing of cyclic cytotoxic chemotherapy can worsen neutropenia and neutrophilia. *British Journal of Clinical Pharmacology*,87,687-693.
- Nandhakumar, R., Kasinathan, N. K., Sivasithamparam, N. D.** (2013). Protective role of morin on the attenuation of chemotherapeutic agent, 5-fluorouracil, induced biochemical alterations in erythrocyte membrane—an *in vivo* animal study. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3, 19-25.
- Nicholas, R., Brownlee, James, J., Huttner, Rao, V., Panganamala, David, G. Cornwell.** (1977). Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: methemoglobin, lipid peroxidation, and hemolysis. *Journal of Lipid Research*, 18,635-644.
- Oun, R., Moussa, Y.E., Wheate, N.J.** (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton transactions*, 47, 6645-6653.
- Panis, A. C. S. A., Herrera, V. J., Victorino, F. C., Campos L.F., Freitas T., De Rossi A. N., Colado Sima, A.L., Cecchini, R.** (2012). Oxidative stress and hematological profiles of advanced breastcancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin Chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 133, 89–97.
- Paula, M., Checchi, J., Netteles, H., jun Zhou, J., Snyder, P., Harish, J.** (2003). Microtubule interacting drugs for cancer treatment *Trends in pharmacology, science* 24.
- Pelli, K., Lyly, M.** (2003). Les antioxydants dans l'alimentation. *Flaire & Flour*, Paris 3eme edition, 628.

- Peters, G., Van derwilt, C.L., Avan Moorsel, C.J., Kroep, J. R., Bergman, S.M., Ackland, S.P.** (2000). Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolite. *Pharmacology & therapeutic*, 87, 227-253.
- Pincemail, J. et al.** (1998). Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*. 3, 133-8.
- Pizzino, G., Irrera N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Vincenzo A., Suadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A.** (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and cellular Longevity*, 13.
- Raina, K., Agarwal, R.** (2007). Combinatorial strategies for cancer eradication by silibinin and cytotoxic agent: efficacy and mechanisms. *Actapharmacologica sinica*, 28, 1466-1475.
- Ramadass, N., Nirmal, K. K., Niranjali, D.S.** (2013). Protective role of morin on the attenuation of chemotherapeutic agent, 5-fluorouracil, induced biochemical alterations in erythrocyte membrane – an in vivo animal study. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3, 19–25.
- Raval, J. S., Fontes, J., Banerjee, U., Yazer, M. H., Mank, E., Palmer, A. F.** (2013). Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. *Transfusion Medicine*, 23, 87-93.
- Remesh, Ambili.** (2012). Toxicities of anticancer drugs and its management. *International Journal of basic and clinical Pharmacology*, 1, 1-12.
- Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M.** (2001). Melissa officinalis, L: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Supercritical Fluids*, 21 51-60.
- Richard, S., Stein., Gordana, V., Alva, B., Weir.** (2012). Cancer- and Chemotherapy Induced Anemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 10, 628-653.
- Sanjun, S., Likai, Y, Qiu'e, Y., Xin, L., Yue, M., Zhaol, Y.** (2018). Ascorbic Palmitate as a Bifunctional Drug and Nanocarrier of Paclitaxel for Synergistic Anti-Tumor Therapy. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14, 1601–1612.
- Seyidoglu, S.N., Aydin, C.** (2020). Stress, Natural Antioxidants and Future Perspectives. In *The Health Benefits of Foods-Current Knowledge and Further Development. IntechOpen.*
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R. S., Pessarakli, M.** (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 1-26.
- Sies, H. Jones, D. P.** (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 363-383.

- Songbo, M.L., Xinyong H., Bin C., Ping X. Z., Liang, S.** (2019). Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology Letter*, 307, 41-48.
- Sosaa, V., Molinéa, T., Somozaa, R., Paciuccib, R., Kondohc, H., Matilde, E., Leonarta, L.** (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12, 376– 390.
- Sung, H., Ferlay, J., Rebecca, L., Siegel, M., Laversanne., Soerjomataram, I., Ahmedin, J., Bray, F.** (2020). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CANCER J CLIN* 2021, 71, 209–249.
- Tabaczar, S., Pieniążek, A, Czepas, J., Piasecka-Zelga, J., Gwoździński, K., Koceva-Chyla, A.** (2013). Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *Medicine chemistry*, 32, 535–543.
- Tong, L., Chuang, C., Wu, C.S., Zuo, L.** (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letter*, 367, 18-25.
- Toussaint, J.F., Jacob, M.P Lagrost., chapman, J.** (2003). L'athérosclérose: physiopathologie diagnostique thérapeutique. *Edition Masson. Paris.* 95.
- Valens, F.** (2005). Morphologie des cellules sanguines normales, 1-15.
- Valéria, A., Barros, Gláécia, A., Pereira, N., Sirlene, S.B., Ota, Fernanda, P.A., Melo, Ana, C., Anderson, B., Lima, Albérico, B.F., Silvac, D., Rosivaldo, S., Borges.**(2021). A Theoretical Antioxidant Mechanism for Cytoprotective Effect of p-Acetamide Salicylate Derivatives against Free Radical Initiator AAPH in Human Erythrocytes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 00, 1-7.
- Vergely, C., Rochette, L.** (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique cardiologie*, 3, 131-139.
- Volodymyr, Lushchak, I.** (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemical Biological Interactions*, 224,164-75.
- Wajcman, H.** (2005).Haemoglobins: structure and function. *Hematology*, 2, 145–157.
- Wang, Q., Zennadi, R.** (2020). Oxidative Stress and Thrombosis during Aging: The Roles of Oxidative Stress in RBCs in Venous Thrombosis. *International Journal Molecular Science*, 21, 1-22.
- Warraich, U. E.Hussain, F.Kayani, H. U. R.** (2020). Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*, 6, 04-107.
- Yehye, W. A., Rahman N. A., Ariffin A., Abd Hamid, S. B., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., Yaeghoobi, M.** (2015). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 295-312.

**Yuan, Ma., Yu, S., Shuaijian, Baoxian, Chun Fai Kung, A., Jin, G., Aiping, Lu., Zhang, G.** (2021). Targeting Strategies for Enhancing Paclitaxel Specificity in Chemotherapy. *In cell and developmental biology*, 9, 1-17.

**Zhang, J. J., Wang, J. Q., Xu, X. Y., Yang, J. Y., Wang, Z., Jiang, S., Li, W.** (2020). Red ginseng protects against cisplatin-induced intestinal toxicity by inhibiting apoptosis and autophagy via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Food & Function*, 11, 4236-4248.

**Zhao P., Wang J. , Ma H., Xiao Y., Tong C., Wang Z., Zheng Q., Dolence E. k., Nair S., Ren J., Li J. A.** (2009). Nwly synthetic chromium complex-chromium (D – phenylalanine) 3activates AMPactivated protein kinase and stimulates glucose transport. *Biochemistry pharmacology*, 77, 1002-10

## Résumé

Le travail présenté dans ce mémoire contribue à explorer l'effet des vitamines C et E ainsi que leur combinaison, associés aux anticancéreux à savoir le paclitaxel (PXT) et l'etoposide (VP16) sur des globules rouges (GRs). Nous avons évalué l'hémolyse des érythrocytes à travers la quantification de la concentration cellulaire et de l'hémoglobine libérée et intracellulaire. Un autre paramètre a été mesuré qui est le taux de la méthémoglobine libérée afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire impliqué par ces vitamines C et E. Nous avons démontré à travers cette étude que malgré le pouvoir antioxydant et protecteur des vitamines C et E mais ces dernières peuvent accentuer ou stimuler l'effet toxique de PXT et de VP16. Les résultats ont montré une forte diminution de la turbidité cellulaire après prétraitement avec la vitamine C ( $0,03\pm 0,006$ ), la vitamine E à  $0,25\text{mg/ml}$  avec un taux de ( $0,046\pm 0,006$ ) ainsi qu'avec la combinaison vitamine C+E ( $0,036\pm 0,022$ ), combiné au paclitaxel en comparant au traitement par le PXT seul ( $0,293 \pm 0,023$ ) et au témoin négatif ( $0,433\pm 0,018$ ). D'autre part, le prétraitement par le VP16 à ( $0,2\text{mg/ml}$ ) n'exerce pas d'effet cytotoxique sur le GR ( $0,808\pm 0,01$ ) en comparant au témoin négatif ( $0,87\pm 0,015$ ). Aussi, nous avons noté que le prétraitement par la vitamine C ( $0,1\text{mg/ml}$ ) combiné au VP16 ( $0,2\text{mg/ml}$ ) n'a pas d'effet cytotoxique sur les GRs. Par contre, le prétraitement par la vitamine E ( $2\text{mg/ml}$ ) combiné au VP16 induit un potentiel effet cytotoxique ( $0,054\pm 0,01$ ). En outre, la combinaison de la vitamine C+E présente un effet cytotoxique hautement significatif ( $0,067\pm 0,016$ ). Quant aux résultats de l'oxydation de l'hémoglobine, la combinaison vitamine C+E génèrent un taux très significatifs en MetHb ( $0,222\pm 0,006$ ). Nous pouvons conclure que les vitamines C et E renforcent la toxicité du PTX via un mécanisme de synergie et nous pouvons admettre que la vitamine C n'exerce pas d'effet synergique avec le VP16 à faible concentration, contrairement à la vitamine E, qui possède un effet stimulateur avec le VP16.

**Mots clés :** vitamine E, vitamine C, anticancéreux, globules rouges, méthémoglobine, stress oxydant.

## Abstract

The work presented in this thesis contribute to explore the effect of vitamins C and E and their combination, associated with anticancer drugs like paclitaxel (PXT) and etoposide (VP16), on red blood cells (RBCs). We evaluated the hemolysis of erythrocytes through the quantification of cell concentration and intracellular and released hemoglobin (Hb). Another parameter was measured which is the rate of released methemoglobin (MetHb) in order to better understand the involved molecular mechanism of these vitamins combined with the anticancer agent on the alteration of erythrocyte membranes and the oxidation of Hb. Despite the antioxidant and protective potential of vitamins C and E, but these can accentuate or stimulate the effect of PXT and VP16. The results showed a strong decrease in cellular turbidity after treatment with vitamin C ( $0.03\pm 0.006$ ), vitamin E at  $0.25\text{mg/ml}$  with a rate ( $0.046\pm 0.006$ ) as well as with the combination vitamin C + E ( $0.036\pm 0.022$ ) combined with paclitaxel compared to treatment with PXT alone ( $0.293 \pm 0.023$ ) and negative control ( $0.433\pm 0.018$ ). On the other hand, the pre-treatment with VP16 does not exhibit a cytotoxic effect on RBs ( $0.808\pm 0.01$ ) comparing to the negative control ( $0.87\pm 0.015$ ) we have noted that treatment with vitamin C ( $0.1\text{mg/ml}$ ) combined with VP16 ( $0.2 \text{mg/ml}$ ) has not cytotoxic effect. On the other hand the pre-treatment with vitamin E ( $2\text{mg/ml}$ ) combined with VP16 induce a potential cytotoxic effect ( $0.054\pm 0.01$ ). Furthermore, the combination of vitamin C+E exhibits a highly significant cytotoxic effect ( $0.067\pm 0.016$ ). As for the results of Hb oxidation, the combination vitamin C+E generate a very significant rate of MetHb ( $0.222\pm 0.006$ ). We conclude that vitamins C+E reinforce the toxicity of PTX via a synergistic mechanism and we can admit that vitamin C does not exert a synergetic effect with VP16 at low concentration, unlike vitamin E, which has a stimulatory effect with VP16.

**Keywords:** vitamin E, vitamin C, anticancer, red blood cells, methemoglobin, oxidative stress.

