

Université MUSTAPHA Stambouli
Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي
معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

THESE de DOCTORAT de 3^{ème} cycle

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Sciences, Technologie et Santé

Option : Microbiologie/Biotechnologie

Intitulée

Biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies en thérapeutique des extraits polyphénolique de *Atriplex halimus* : évaluation de la flore intestinale suite à un traitement chimio-thérapeutique chez des patients souffrants d'un cancer colorectal.

Présentée par : M^{me} ZENNAF Ikram

Le...../...../20.....

Devant le jury :

Président	HARIRI Ahmed	Professeur	Université M. S. de Mascara
Examineur	DJAFRI Fatiha	Professeur	Université B.B. d'Oran
Examineur	MELIANI Samia	Maitre de conférences A	Université I.K. de Tiaret
Examineur	CHELLI Nadia	Maitre de conférences A	Université M. S. de Mascara
Examineur	AISSAOUI Yamina	Maitre de conférences A	Université M. S. de Mascara
Directrice de Thèse	TIR TOUIL Aicha	Professeur	Université M. S. de Mascara

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

{ يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ

آمَنُوا مِنْكُمْ

وَالَّذِينَ أُوتُوا

الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ }

[المجادلة : 11]

صَلَّى اللَّهُ عَلَيْكَ الْعَظِيمِ

Remerciements

*Avant tous, louange à ALLAH le tout miséricordieux pour son guide,
Son aide dans un parcours acharné envers le savoir scientifique et qui
nous a permis de mener à bien ce modeste travail.*

*J'exprime ma haute gratitude et ma profonde
Reconnaissance à:*

M^{me} Professeur TIRTOUIL A.

*Je tiens à vous remercier vivement d'avoir accepté la direction
scientifique de ma thèse de doctorat, de m'avoir soutenue et aidée à
réaliser ce travail avec rigueur et patience.*

M^r Professeur HARIRI A.

*Je vous remercie de l'honneur que vous nous faite en acceptant de
présider le jury.*

Aux Professeurs DJAFRI F., MELIANI S., CHELLI N. et AISSAOUI Y.

*Je vous remercie d'avoir gentiment accepté de participer à
l'évaluation de cette thèse, consciente du travail que cela représente.*

*Mes vifs remerciements à tous les professeurs et amis de notre faculté
SNV pour vos aides, vos encouragements, vos orientations et vos
conseils enrichissants.*

*J'exprime également mes sincères remerciements au personnel de
l'animalerie : Aziz, la directrice de la ferme expérimentale,..., ainsi
qu'aux personnels des laboratoires pédagogiques de l'université de
Mascara*

*Un remerciement spécial à ma famille notamment à mes très chers
parents, à ma petites familles, à mes amis et collègue et à tout ceux qui
mon aidé et soutenu pour la réalisation de cet ouvrage*

Merci à vous tous.....

Dédicace

J'ai l'honneur de dédié ce travail a mes chers parents les prunelles de mes yeux, mon courage, ma force face aux difficultés de la vie et mon chemin vers réussite. Sans lesquelles je ne serai rien. Grâce à leurs sacrifices et leur éducation, pour leur soutien moral et matériel pendant toute ma vie. Ils ont été à mes côtés et partager mes rêves, mes joies, et mes espérances, J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour. que Dieu les garde.

A mes chers enfants qui me donnent la force de me levé chaque jours et d'allez à l'avant. Tous en espérant être leurs modèles

A toutes ma famille et amies qui ont toujours crue en moi

A mes défunte grands mère qui m'en encouragé et espéré me voir réussir.

Résumé

Cette thèse réunit un ensemble de recherches à différents volets sur une plante médicinale largement utilisée par la population locale l'*Atriplex halimus* «**Guetaf**» : Une enquête ethnobotanique, l'analyse des phyto-constituants, la toxicité ainsi que l'objectif principale de l'étude: l'évaluation de l'activité anticancéreuse par deux traitements (préventif et curatif) et la caractérisation du microbiote intestinal.

Le protocole consiste en l'induction du cancer colorectal par le 1,2-Diméthylhydrazine (DMH) chez les rats males de race Wistar. A cet essor, deux types de traitements ont été élaborés :

Le traitement préventif lors de l'induction du cancer, composé de trois groupes traités par l'extrait de la plante à différents moments : T0, T5 et T15.

Le traitement curatif réalisé une fois la tumorigénèse établie sur trois groupes de rats qui ont reçu différents traitements: l'extrait de la plante, la chimiothérapie (Xélox) et la combinaison des deux (extrait de la plante et chimiothérapie).

Les résultats obtenus de l'enquête ethnobotanique sur l'*Atriplex h.* ont clairement démontré son importance dans la phytothérapie Algérienne pour le traitement de différentes pathologies.

L'étude phytochimique a prouvé la richesse de l'extrait de la plante en phytoconstituants bénéfiques pour la santé avec un polymorphisme des molécules phénoliques dont Trois acides phénoliques et des flavonoïdes, Le composé le plus émergent est la Catechine avec un taux de (717 µg/g DM) suivie de la Rutine (360,84 µg/g DM) ainsi qu'une importante activité antioxydante.

L'évaluation de l'activité anticancéreuse de l'extrait de la plante a montré des effets protecteurs contre le cancer colorectal. Un effet préventif, par l'utilisation de l'extrait en même temps que le DMH qui a diminué le nombre de foyer de crypte aberrante (AFC) de (13%) et a modulé le taux des marqueurs tumoraux ACE et CA19.9 de (0.15 et 0.27 ng/ml) comparé aux groupe DMH qui présentent des taux de (6.14 et 10.15 ng/ml) respectivement. En plus, un effet curatif, indiquant des résultats intéressants suite à l'utilisation de l'extrait de la plante en combinaison avec la chimiothérapie par : la protection des fonctions vitales (hépatiques et rénales), un aspect histologique bénin ainsi que des taux des marqueurs tumoraux proches de la normale.

Par ailleurs, l'analyse du microbiote intestinal montre un polymorphisme en faveur des germes aérobie et anaérobies pathogènes chez les rats DMH avec des taux de (6,3, 11,3 Log UFC/g) comparé au groupe témoin avec des taux de (5,12, 9,7 Log UFC/g) respectivement. Par contre, l'utilisation des traitements à base d'extrait de la plante et le traitement combinant chimiothérapie et plante procure les meilleurs résultats avec des taux élevés de probiotique tel que *Lactobacillus sp.*

En conclusion, l'*Atriplex halimus* est une plante très riche en phytoconstituants ce qui explique son utilisation dans le traitement de différentes pathologies en médecine traditionnelle. Notre étude a permis de démontrer son rôle chimio-préventif et synergique avec la chimiothérapie en renforçant sa potentialité anti-tumorale et en réduisant ses effets secondaires ainsi qu'une importante activité anti-inflammatoire et antimicrobienne.

Mots clés : Cancers Colorectal, Marqueurs Tumoraux, *Atriplex halimus*, Microbiote Intestinal

Abstract

This study combines a set of researches on a medicinal plant widely used by the local population, *Atriplex halimus* "Guetaf": an ethnobotanical survey, the analysis of the phytoconstituents, the toxicity as well as the main objective of the study: the evaluation of the anticancer activity by two treatments (preventive and curative) and the characterization of the intestinal microbiota.

The protocol consists in the induction of colorectal cancer by 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) in male Wistar rats. To that end, two types of treatments were developed:

The preventive treatment during cancer induction, consisting of three groups treated with the plant extract at different times: T0, T5 and T15.

The curative treatment carried out after the establishment of the tumorigenesis in three groups of rats that received different treatments: the extract of the plant, chemotherapy (Xelox) and the combination of both (extract of the plant and chemotherapy).

The results obtained from the ethnobotanical survey of *Atriplex h.* have clearly demonstrated its importance in Algerian phytotherapy for the treatment of different pathologies.

The phytochemical study proved the richness of the plant extract in beneficial phytoconstituents for health with a polymorphism of phenolic molecules including Three phenolic acids and flavonoids, the most emerging compound is Catechin with a rate of (717 µg/g DM) followed by Rutin (360,84 µg/g DM) as well as an important antioxidant activity.

The evaluation of the anticancer activity of the plant extract showed protective effects against colorectal cancer. A preventive effect, by the use of the extract simultaneously with DMH which decreased the number of aberrant crypt foci (AFC) by (13%) and modulated the level of tumor markers ACE and CA19.9 by (0.15 and 0.27 ng/ml) compared to the DMH group which had levels of (6.14 and 10.15 ng/ml) respectively. In addition, a curative effect, indicating interesting results following the use of the plant extract in combination with chemotherapy by: the protection of vital functions (hepatic and renal), a benign histological aspect as well as levels of tumor markers close to normal.

Moreover, the analysis of the intestinal microbiota showed a polymorphism in favor of aerobic and anaerobic pathogenic germs in DMH rats with levels of (6.3, 11.3 Log UFC/g) compared to the control group with levels of (5.12, 9.7 Log UFC/g) respectively. On the other hand, the use of the plant extract-based treatments and the combined chemotherapy and plant treatment provided the best results with high levels of probiotic such as *Lactobacillus sp.*

In conclusion, *Atriplex halimus* is a plant very rich in phytoconstituents which explains its use in the treatment of various pathologies in traditional medicine. Our study has demonstrated its chemopreventive and synergistic role with chemotherapy by reinforcing its anti-tumor potentiality and reducing its side effects as well as an important anti-inflammatory and antimicrobial activity.

Keywords: Colorectal cancers, Tumor markers, *Atriplex halimus*, Intestinal microbiota

ملخص

تجمع هذه الدراسة مجموعة من الأبحاث في مجال نبات طبي يستخدم على نطاق واسع من قبل السكان المحليين و هو " القطف " *Atriplex* ، تتضمن هذه الرسالة دراسة اثنبوتانية و تحليل المركبات الكيميائية لهذه النبتة و دراسة السمية ، بالإضافة إلى تقييم النشاط المضاد للسرطان باستخدام علاجين (الوقائي و العلاجي) وتحليل الميكروبيوم المعوي .

يتكون البروتوكول من تحفيز سرطان القولون و المستقيم باستخدام 1,2 ديميثيل هيدرازين في ذكور جرذان الوبستار. وتم تطوير نوعين من العلاجات

- العلاج الوقائي تم أثناء تحفيز السرطان ، و يتمثل ثلاثة مجموعات معالجة في أوقات مختلفة T 15 ، T5 و T0 بمستخلص النبتة.

-العلاج الدوائي يتم اجراؤه بعد تكون الورم على ثلاث مجموعات التي تلقت العلاجات التالية : مستخلص النبتة ، العلاج الكيميائي نوع (xelox) و المستخلص النبتة و العلاجي الكيميائي (xelox).

أظهرت نتائج الدراسة الإثنوبوتانية للقطف بوضوح أهميتها لعلاج عدة أمراض .وقد أثبتت الدراسة الفيتوكيميائية غنى مستخلص النبتة بالمركبات المفيدة للصحة، مع وجود تعدد للجزيئات الفينولية بما في ذلك ثلاثة أحماض فينولية والفلافونويدات، وأبرز المركبات هي الكاتيشين بنسبة (717 ميكروجرام/مغ) يليها الروتين (360.84 ميكروجرام/مغ) بالإضافة إلى نشاط مضاد للأكسدة هام.

أظهر تقييم النشاط المضاد للسرطان لمستخلص النبتة تأثيرات واقئية ضد سرطان القولون والمستقيم. حيث أظهر تأثيراً وقائياً عند استخدام المستخلص مع DMH ، حيث قلل من عدد الخلايا (13%) وخفض مستويات علامات الورم ACE و CA19.9 (0.15 و 0.27نانوغرام/مل) مقارنةً بمجموعة DMH التي كانت مستوياتها (6.14 و 10.15 نانوغرام/مل) على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، أظهر تأثيراً علاجياً ونتائج مثيرة للاهتمام عند استخدام مستخلص النبات مع العلاج الكيميائي، حيث قام بحماية الوظائف الحيوية (الكبدية والكلىوية)، كما بينت النتائج الهيستولوجية مستويات قريبة من الحالة الطبيعية.

فيما يخص تحليلات الميكروبيوم المعوي أظهرت تنوعاً نوعياً بالنسبة إلى البكتيريا الهوائية و اللاهوائية الممرضة لدى مجموعة DMH ، بنسب (6.3 و 11.3 لوغ UFC / غ) على التوالي، مقارنةً بالمجموعة الشاهدة التي بلغت نسبها (5.12 و 9.7 لوغ UFC / غ) على التوالي. وعلى الجانب المقابل، يؤدي استخدام مستخلص النبتة مع العلاج الكيميائي إلى أفضل النتائج مع نسب مرتفعة من البروبيوتيك مثل نوع *Lactobacillus*

و خلاصة، فإن القطف هي نبتة غنية جداً بالمركبات النباتية مما يفسر استخدامها في علاج عدة أمراض في الطب التقليدي. أظهرت دراستنا دورها الوقائي والتأزري مع العلاج الكيميائي من خلال تعزيز فعاليتها المضادة للأورام وتقليل أثارها الجانبية، بالإضافة إلى نشاطها الهام في مكافحة الالتهابات و تعديل الميكروبيوم المعوي .

الكلمات الرئيسية: سرطان القولون والمستقيم، علامات الأورام، القطف ، الميكروبيوم المعوي

Table des Matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
<i>Etude Bibliographique</i>	
<i>Chapitre I : Le Cancer colorectal</i>	
1. Rappel du colon physiologique et fonctionnel	04
2. Le cancer colorectal	05
2.1.Type de cancer colorectal	05
2.1.1. Les cancers sporadiques	05
2.1.2. La polypose Adénomateuse Familiale (PAF)	05
2.1.3. Le syndrome de Lynch (syndrome HNPCC)	06
2.2.Histoire naturelle du cancer colorectal	06
2.2.1. Foyer de cryptes aberrantes	06
2.2.2. Adénomes	06
2.2.3. Adénocarcinome in situ	07
2.2.4. Les métastases	07
2.3.Phases de développement tumoral	08
2.3.1. Phase d'initiation	08
2.3.2. Phase de promotion	08
2.3.3. Phase de progression	08
2.3.4. Phase d'invasion	08
2.4.Propriétés et caractéristique de la tumorigenèse	11
2.4.1. L'autosuffisance en signaux de croissance	12
2.4.2. L'insensibilité aux signaux inhibant la croissance	12
2.4.3. Potentiel répliatif illimité	12
2.4.4. Echappement à l'apoptose	12
2.4.5. Induction de l'angiogenèse	12
2.4.6. Invasion des tissus et métastases	12
3. Les gènes ciblés dans les cancers	13
3.1.Les oncogènes	13
3.2.Les gènes suppresseurs de tumeur	13
4. Les bases moléculaires du cancer colorectal	14
4.1.Instabilité génétique	15
4.1.1. Instabilité chromosomique	16
4.1.2. Instabilité microsatellitaire	17
4.1.3. Mutations ponctuelles	17
4.2.Instabilité épigénétique	18
4.2.1. Les anomalies de méthylation de l'ADN	18
4.2.2. Modifications des histones et des protéines de remodelage de la chromatine	19
4.2.3. Les ARN non codants	19
5. Les voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colorectale	20
5.1.Voies <i>Wnt/β-caténine</i>	20
5.2.Voies <i>EGFR/RAS/RAF/MAPK</i>	21

Table des Matières

5.3.Voie PI3K/AKT	21
5.4.Voie <i>TGF-β/SMAD</i>	22
5.5.Voie <i>TP53</i>	22
5.6.Voie <i>NF-κB</i>	22
6. Traitement du cancer colorectal	23
6.1.La chirurgie	23
6.2.La radiothérapie	23
6.3.La chimiothérapie	23
6.4.Les effets secondaires de la chimiothérapie	24
Chapitre II : Les marqueurs tumoraux	
1. Rappel historique des marqueurs tumoraux	25
2. Définition des marqueurs	25
3. Caractéristique des marqueurs tumoraux	26
4. Intérêt clinique des marqueurs tumoraux	26
4.1.L'intérêt dans le dépistage et la sélection des populations à risque	26
4.2.L'intérêt dans le diagnostic	27
4.3.L'intérêt dans le pronostic, le suivi thérapeutique et la détection des récurrences	27
5. Les marqueurs tumoraux du tube digestif disponibles	28
5.1.Les marqueurs tumoraux sériques	28
5.1.1. Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)	28
5.1.2. L'antigène carbohydre 19-9 (CA19-9)	29
5.1.3. L'Alpha fœtoprotéine (AFP)	29
5.1.4. L'anticorps sérique anti-P53	30
5.2.Les marqueurs tumoraux moléculaires	30
5.2.1. Les mutations de l'oncogène KRAS	31
5.2.2. ADN Méthylé (Test Septine 9)	31
5.2.3. Les mutations de l'ADN mitochondrial	32
5.3.Recherche de sang dans les selles	32
Chapitre III : Le microbiote intestinal	
1. Le microbiote intestinal	33
1.2.Rôle du microbiote intestinal	33
1.3.Phylogénèse du microbiote intestinal	34
1.4.La barrière muquo-intestinale	36
2. Facteur influençant la composition du microbiote	38
2.1.Le régime alimentaire	38
2.2.Les facteurs environnementaux	39
2.3.Les facteurs génétiques et maladies	39
3. Interaction du microbiote intestinal	40
3.1.Microbiote et hôte	40
3.2.Le Microbiote et le système immunitaire	40
4. La dysbiose intestinale	43
4.1.Microbiote et le cancer colorectal	43
4.2.L'alimentation et le cancer	44
4.3.Les intermédiaires réactifs de l'oxygène	45
4.4.L'inflammation et le cancer	45
4.4.1. Rôle de l'inflammation dans la phase d'initiation du cancer	46
4.4.2. Rôle de l'inflammation dans la phase de promotion du cancer	46

Table des Matières

4.5.La virulence bactérienne et le cancer	47
Chapitre IV : Les plantes médicinales	
1. La phytothérapie	48
1.1.L'ethnopharmacologie	48
1.2.Les plantes anticancéreuses	49
1.3.Mécanisme d'action	51
1.4.Rôle des polyphénols dans la prévention et le traitement du cancer	52
2. Étude botanique de l' <i>Atriplex halimus</i>	54
2.1.Généralité	54
2.2.Noms vernaculaires	54
2.3.Répartition géographique de l' <i>A. halimus</i>	54
2.4.Description morphologique	55
2.5.Classification	55
2.6.Etude phytochimique	56
2.7.Usages thérapeutiques d' <i>A. halimus</i>	56
Etude Expérimentale	
I. Matériels	59
1. Matériel végétal	59
2. Les animaux	60
II. Méthodes	61
1. ETUDE ETHNOBOTANIQUE	61
1. Collecte des données	61
2. Analyse des données	61
2. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	62
1. Préparation du matériel végétal	62
2. Rendement de l'extraction	62
3. Screening phytochimique	62
4. Analyse de l'extrait d'infusion de l' <i>Atriplex halimus</i> par HPLC sur Système LC Prominence-i LC 2030C	63
5. Dosage des polyphénols	63
5.1.Polyphénols totaux	63
5.2.Flavonoïdes	63
5.3.Les tanins condensés	64
5.4.Activité antioxydante	64
3. ETUDE DE LA TOXICITE	65
1. Toxicité orale aiguë	65
2. Toxicité orale subchronique	65
3. Suivi de la toxicité	65
4. EVALUATION <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i> DE L'ACTIVITE DE L'<i>Atriplex halimus</i> SUR LE CANCER COLORECTAL CHIMIO-INDUIT	67
1. Principe	67
2. Protocole d'induction du cancer colorectal	67
3. Etapes de tumorigénèse chimio-induite	68

Table des Matières

4. Evaluation du traitement par l' <i>Atriplex halimus</i> dans cancer colorectal induit	69
4.1.Traitement préventif	70
4.1.1. Choix du traitement par l' <i>Atriplex halimus</i>	70
4.2.Traitement curatif	72
4.2.1. Le choix du traitement chimio-thérapeutique	72
4.3.Sacrifices et Prélèvement des échantillons	75
4.4.Dosage des marqueurs tumoraux	76
4.5.Détermination foyers de cryptes aberrantes (ou aberrant crypt foci ACF)	76
4.6.Etude histologique des colons	77
5. EVALUATION DU MICROBIOTE INTESTINAL:	77
4.7. Identification du microbiote intestinal	78
4.7.1. Identification par méthode MALDI-TOFMS	78
5. Analyses statistiques	79
Résultats et Discussion	
1. ETUDE ETHNOBOTANIQUE	
1. Présentation de l'étude	80
2. Utilisation thérapeutique de l' <i>Atriplex h.</i>	80
3. Partie floristique utilisé	81
4. Mode de préparation	82
2. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	
1. Rendements des extractions	83
2. Criblage phytochimique	84
3. Identification des composés phénoliques de l'extrait d'infusion par HPLC	85
4. Dosage du contenu phénolique des extraits	87
5. Pouvoir antioxydant des extraits	89
3. ETUDE DE LA TOXICITE	
1. Toxicité aiguë	91
2. Toxicité subaiguë	92
4. EVALUATION IN VIVO ET IN VITRO DE L'ACTIVITE DE L'<i>Atriplex halimus</i> SUR LE CANCER COLORECTAL CHIMIO-INDUIT	
4.1.Evaluation du traitement préventif	97
4.1.1. L'évolution du poids corporel suite au traitement préventif	97
4.1.2. L'évaluation du poids relatif des organes suite au traitement préventif	97
4.1.3. Paramètre biochimique suite au traitement préventif	99
4.1.4. Paramètres hématologiques suite au traitement préventif	101
4.1.5. Dosage des marqueurs tumoraux suite au traitement préventif	103
4.1.6. Evaluation du nombre AFC suite au traitement préventif	104
4.2.Evaluation du traitement curatif	107
4.2.1. L'évolution du poids corporel des rats suite au traitement curatif	107
4.2.2. Aspect et poids relative des organes suite au traitement curatif	108
4.2.3. Paramètres biochimiques suite au traitement curatif	110
4.2.4. Paramètre hématologique suite au traitement curatif	113
4.2.5. Étude des marqueurs tumoraux suite au traitement curatif	116
4.2.6. Étude d'histologie suite au traitement curatif	117
5. L'EVALUATION DU MICROBIOTE INTESTINAL	
Conclusion	

Table des Matières

Références Bibliographique	
Annexe	
Publication scientifique	

Liste des Tableaux

Tableau N°01: Effets indésirables des molécules utilisées en chimiothérapie	24
Tableau N° 02: Différences entre l'interaction des micro-organismes commensaux et pathogènes sur leur hôte	40
Tableau N°03 : Interaction entre le microbiote et le système immunitaire	42
Tableau N° 04: Plante à activité anticancéreuse	49 50
Tableau N° 05: liste de quelques composés naturels utilisés comme anticancéreux	50
Tableau N° 06: Les différents groupes du traitement préventif	70
Tableau N°07 : Les différents groupes de traitement curatif	73
Tableau N°08 : Protocole de chimiothérapie utilisé dans l'étude de l'activité anticancéreuse	73
Tableau N°09: Rendements des extraits de la plante	83
Tableau N°10 : Tests phytochimique d'extrait aqueux de l' <i>Atriplex halimus</i>	84
Tableau N°11 : Composés phénoliques de l'extrait d'infusion de l' <i>Atriplex halimus</i> analysé par HPLC sur Système LC Prominence-i LC 2030C	85
Tableau N°12: Contenu polyphénolique des extraits aqueux de l' <i>Atriplex halimus</i>	87
Tableau N°13: le pouvoir antioxydant des extraits de l' <i>Atriplex halimus</i> par test DPPH	89
Tableau N°14: Effet des l'extraits de l' <i>Atriplex h.</i> sur les paramètres biochimique au cours de la toxicité subaiguë	95
Tableau N°15 : l'effet des l'extraits de l' <i>Atriplex h.</i> sur les paramètres hématologiques au cours de la toxicité subaiguë	95
Tableau N°16: Nombre des foyers des cryptes aberrantes lors de l'évaluation de l'activité préventif des extraits de l' <i>Atriplex h.</i>	105

Liste des Figures

Figure N°01 : Structure de la paroi du côlon	04
Figure N°02 : Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique.	09
Figure N°03: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire	10
Figure N°04: Propriétés et Caractéristique de la tumorigénèse	11
Figure N°05: Modèle génétique de la tumorigénèse colorectal	13
Figure N°06: Schéma récapitulatif des bases moléculaires du cancer colorectal	14
Figure N°07: Les deux principales voies de carcinogénèse colorectale. A) voie CIN; B) voie MSI	15
Figure N°08: L'arbre phylogénétique des bactéries du microbiote intestinal	35
Figure N°09: L'homéostasie intestinale	37
Figure N°10 : Image représentatif de la plante <i>Atriplex halimus</i>	55
Figure N°11: l' <i>Atriplex halimus</i>	59
Figure N°12: Situation géographique de la station de collecte	59
Figure N°13 : Schéma des étapes de cancérogénèse chimio-induite par le DMH	68
Figure N°14: Protocole de l'étude de l'activité anticancéreuse de l' <i>Atriplex halimus</i>	69
Figure N°15: Schéma récapitulatif de l'étude de l'activité préventif de l' <i>Atriplex h.</i>	71
Figure N°16: Schéma récapitulatif de l'étude de l'activité anticancéreuse par différents traitements	74
Figure N°17 : les biomarqueurs analysé des colons	75
Figure N°18: Techniques d'ensemencement et d'isolement du microbiote intestinal	78
Figure N°19: Fréquence de citation des pathologies traitées par l' <i>Atriplex halimus</i>	80
Figure N°20: Fréquence citation des parties floristiques utilisées	81
Figure N°21 : Fréquences des modes l'utilisation de la plante	82
Figure N°22 : Identification des composés phénoliques de l'extrait d'infusion de <i>A. halimus</i> . par HPLC sur Système LC Prominence-i LC 2030C	85
Figure N°23: Schéma récapitulatif de l'étude de toxicité	91
Figure N°24 : Evolution pondérale des rats des deux sexes dans les conditions de la toxicité aigue	92
Figure N°25: Effet de l' <i>Atriplex h</i> sur, A) L'évolution pondérale, B) Poids relatif des organes des rats dans les conditions de la toxicité subaiguë.	93
Figure N°26: Schéma récapitulatif de l'évaluation de l'activité de l' <i>Atriplex halimus</i> sur le cancer colorectal chimio-induit par le DMH	96

Liste des Figures

Figure N°27: Effet de l'activité de l' <i>Atriplex halimus</i> dans l'étude du traitement préventif A) Le poids des rats, B) Le poids relative des organes	98
Figure N°28: Evaluation des paramètres biochimiques dans l'étude du traitement préventif A) Bilan hépatique, B) Bilan rénal, C) Bilan lipidique	100
Figure N°29 : Evaluation des paramètres hématologique dans l'étude du traitement préventif. A) Nombre de globules blancs, B) Nombre de globule rouge, C) Nombre de plaquettes sanguines	102
Figure N°30 : Taux des marqueurs tumoraux ACE et CA19.9 dans l'évaluation du traitement préventif	104
Figure N°31: Observation microscopique des foyers de cryptes aberrantes dans colons des rats DMH colorés au bleu de méthylène (X40)	105
Figure N°32: Evaluation du traitement curatif. A) Evolution du poids corporel des rats, B) le poids relatif des organes	109
Figure N°33: Evaluation des paramètres biochimiques dans l'étude du traitement curatif. A) Bilan rénal, B) Bilan hépatique, C) Bilan lipidique	112
Figure N°34: Evaluation des paramètres hématologique dans l'étude du traitement curatif. A) Nombre de globules blancs, B) Paramétrées hématologique, C) Nombre de plaquettes sanguines.	115
Figure N°35: Evaluation du taux des marqueurs tumoraux dans l'étude du traitement curatif	117
Figure N°36: Examen histologique des sections coliques des rats. A) Témoin, B) DMH, C) Traité par la plante, D) Traité par la plante et la chimiothérapie, E) Traité par la chimiothérapie.	118
Figure N°38: Evaluation du microbiote intestinale suite aux différents traitements de l'activité anticancéreuse.	120
Figure N°39: Chromatogrammes MALD-TOF-SM des souches <i>Enterobacter cloacae</i> isolé à partir des colons des rats induit par le DMH.	121

Liste des abréviations

ACE: Antigène Carcino-Embryonnaire	MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
ADH: Alcool Déshydrogénase	MMR: MisMatch Repair System
ADN : Acide Désoxyribonucléique	MPO : myéloperoxydase
AFC: Aberrant Crypt Foci (foyer des crypte aberante)	MSI: Mirosatellite instability
AFP: Alpha Foetoprotéine	NAFLD: Non-Alcoolic Fatty Liver Disease
Ag : Antigène	NF-κB: Nuclear Factor Kappa B
AOM: Azoxyméthane	NK: Lymphocytes Natural Killer « tueur naturel »
APC: Adenomatous Polyposis Coli	NLRs: Nod Like Rreceptor
AURKA: Aurora Kinase A	OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development
BUB1: Bunding Uninhibited by Benzimidazol 1 Homologue	OMS: Organisation Mondial de la Santé
CA19-9: Antigène Carbohydrete 19-9	PAL: phosphatase alcaline
CAC: Colitis-Associated Cancer	PI3K: Phosphatidyl inositol 3-Kinase
CAT: Catalase	PRR : Pathogen recognition receptor,
CIN: Chromosomal Instability	RAS: Rat Sarcoma Viral oncogéne homologue
COX : cyclooxygénases	RER: Replicative Error
CRC: Cancer colorectal	SH2: SRC Homology-2
CRP : C-reactive protein	SOD : superoxyde dismutase
DMH: 1,2-diméthylhydrazine	STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
EGCG : épigallocatechine-3-gallate	TAM: Tumor associated Macrophage
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	TBARS : thiobarbituric acid reactive substances
EROs : Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène	TGF- β : Transforming growth factor beta
FAE: Follicle Associated Epithelium	TGF-β: Tumor Growth Factor Beta
FAP: Familial Adenomatous Polyposis	Th1: T helper
GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue	TLRs: Toll Like Receptor
GPx : glutathion peroxydase	TNBS : Acide Trinitrobenzène Sulfonique
GR : glutathion réductase	TNF- α / β : Tumor Necrosis Factor- α / β
GSH : glutathion	TSLP: Thymic Stromal Lymphopoiétin
GSH-Px : glutathion peroxydase	
H: Histone	
HBV: Virus hepatitis B	
HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colon Cancer	
HPV: Epstein Barr Virus	
IgA: immunoglobulines A	
KRAS: Kristen RAS Viral oncogéne homologue	
LB : lymphocytes B	
LP : lamina propria LT : lymphocyte T,	
LTh : lymphocyte T helper,	
MALDI - TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation/ Time-Of-Flight	
MAM: Méthylazoxyméthanol	
MAMP: Microbial Associated molecular Patterns	
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase	
MC: Maladie de Crohn,	
MDA : malondialdéhyde	

Introduction Générale

Introduction Générale

Les cancers, Maladies du siècle cette pathologie se désigne sous une multitude de tumeurs pouvant toucher différents type de tissus de l'organisme et qui ont en commun une croissance cellulaire non contrôlée conduisant à l'invasion des tissus environnants.

Aujourd'hui le cancer continu d'être une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde occasionnant selon l'OMS, 10 millions de décès en 2020, soit presque un décès sur six (**WHO,2020**). Le cancer colorectal est parmi les cancers les plus émergents situés en 3^{ème} position après le cancer du poumon chez l'homme et le cancer du sein chez la femme, présentant ainsi un problème majeur de santé publique et un challenge primordial pour la communauté scientifique afin d'établir un traitement.

Malgré les progrès de la science et la connaissance des mécanismes de développement et progression des cancers, les causes du cancer colorectal ne sont ni parfaitement connues, ni bien radiées. Cependant, la plupart des cancers semblent être le résultat d'un ensemble complexe entre susceptibilité héréditaire et facteurs environnementaux. Les traitements préconisés pour ce type de pathologie sont la chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie.

A l'heure actuelle. Les chercheurs prêtent une attention particulière à l'alimentation et l'environnement dans l'intention d'identifier de nouvelles molécules anticancéreuses naturelles. Dans cet essor, les scientifiques optent pour l'étude d'une large gamme de produits phytothérapeutiques dans des essais chez des modèles précliniques animal transgéniques ou induit par produit chimique (**Heyer J.,1999**).

Les premier modèle animal apprécié pour leurs similitudes macroscopiques et histologiques au carcinome colorectal humain (CRC) remontent à 1963, lorsque **Laqueur** a découvert que des rats nourris à la cycasine, un produit végétal, développaient un cancer de l'intestin. La substance active a été déterminé et ainsi un composé similaire a été identifié, l'acétate de méthylazoxyméthanol (MAM) a été synthétisé et s'est avéré plus efficace que le produit naturel. En 1970, **Druckrey** à découvert que deux produits chimiques structurellement apparentés au MAM, la diméthylhydrazine (DMH) et l'azoxyméthane (AOM) étaient des carcinogènes intestinaux encore plus puissants. Actuellement, le DMH et son métabolite AOM sont les agents inducteurs les plus utilisés dans les modèles expérimentaux de la carcinogenèse colorectale chez les rongeurs (**Shinchi N, Isamu K.1985 ; Shirai T et al. 1983**).

Introduction Générale

Notre recherche s'inscrit dans le cadre des essais préclinique utilisant le DMH (1,2-diméthylhydrazine) pour l'induction du cancer colorectal chez les rats Wistar afin d'évaluer l'efficacité de l'extrait de la plante l'*Atriplex halimus*.

Les plantes ont de tout temps été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines et sont de plus en plus considérées comme source potentielle de médicaments anticancéreux (**Liu et al, 2012., Sharif et al, 2012**). Leur pouvoir de guérison provient des effets de leurs métabolites secondaires. Polyphénols, flavonoïdes et les tanins hydrolysables et condensés (**Feng et al, 2007., Zakaria et al, 2011**). En outre, les polyphénols ont particulièrement démontré des effets anticancéreux à travers les mécanismes impliquant leur propriétés antioxydantes, anti-proliférative et anti-inflammatoire ainsi que leurs effets sur les voies de signalisation intracellulaire faisant intervenir l'apoptose et l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (**Zakaria, 2011., Gonzalez- Sarrias et al, 2012**). Les plantes constituent une source prometteuse de composés chimiothérapeutiques potentiels (**Lambert et al, 2005., McCann, 2007**) comptant plus de 8000 composés différents décrits jusqu'à présent (**Manach et al, 2005**).

L'*Atriplex halimus* est une des plantes médicinales appartenant à la famille des chenopodiaceae largement utilisé en médecine traditionnelle Algérienne grâce à sa richesse en composés phénoliques et de son large panel d'effet bénéfique. L'objectif de cette étude se focalise dans la recherche de l'effet curatif et/ ou préventif dans la pathologie du cancer colorectal par l'évaluation de l'extrait polyphenolique de l'*Atriplex h.*

Notre étude est scindée en deux parties :

La première partie de ce manuscrit constitue l'étude bibliographique portant sur:

- 1- L'histoire naturelle du cancer colorectal ;
- 2- Les marqueurs tumoraux du cancer colorectal ;
- 3- Rôle du microbiote intestinal dans l'induction du cancer colorectal ;
- 4- Un rappel botanique sur la plante *Atriplex halimus* et ses effets biologiques et pharmacologiques.

La deuxième partie concerne l'expérimentation divisée en quatre étapes :

- 1- Une étude ethnobotanique
- 2- Une étude phytochimique

Introduction Générale

- 3- Des évaluations *in vitro* et *in vivo* de l'activité de l'*Atriplex halimus* sur le cancer colorectal chimio-induit
- 4- Evaluation du microbiote intestinal.

Les résultats présentés dans cette thèse sont discutés à la lumière des recherches récentes de la littérature. En fin, une conclusion et perspective clôturent le travail.

Etude Bibliographique

Chapitre I :

Le Cancer Colorectal

1. Rappel du colon physiologique et fonctionnel :

Le colon humain est un organe musculaire d'environ 125 cm de long organisée en deux couches distinctes. À la surface de la lumière intestinale se trouve la couche épithéliale, invaginée et constituée d'un simple feuillet de cellules épithéliales cylindriques. Cette couche de cellules est supportée par un tissu conjonctif appelé le chorion, l'ensemble formant l'unité fonctionnelle du colon appelé crypte de Lieberkühn (Figure 01). La muqueuse est soutenue par une couche de cellules musculaires appelée la musculuse (Sopie de carné T., 2011).

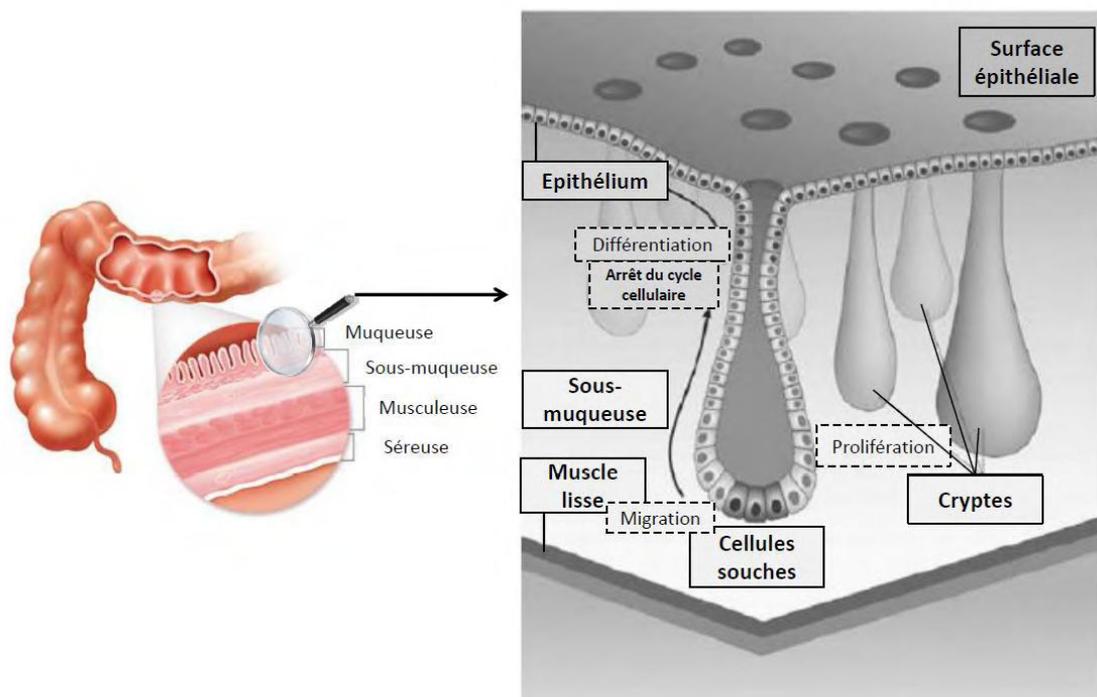


Figure N°1 : Structure de la paroi du côlon

Source : <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/> (INCA; MacFarlane AJ *et al.*, 2007)

Les cryptes de Lieberkühn sont organisées de sorte que les cellules les plus différenciées se trouvent les plus proches de la lumière intestinale et les cellules souches sont localisées dans le fond des cryptes (Radtke et Clevers, 2005).

Le colon contribue à des fonctions importantes de l'organisme : la digestion et l'absorption des aliments non digérés, l'absorption d'eau et d'électrolytes et concentration des matières fécales, l'entreposage et l'évacuation maîtrisée des selles (Rachel G., 2002).

2. Le cancer colorectal :

Selon INC « institue national du cancer », Le cancer désigne des cellules transformé qui s'affranchissent des mécanismes de régulation homéostatique tissulaire. Le colon et le rectum sont des organes composés de différents tissus (Épithéliaux, nerveux et conjonctifs) ou chaque type cellulaire peut potentiellement être l'origine d'un cancer. Cependant, dans la grande majorité des cas (plus de 90%) le cancer colorectal est dû au tissu épithélial qui tapisse l'intérieur de la paroi du colon et du rectum. Ce type de cancer est communément appelé adénocarcinome. Il comprend des sous-groupes d'adénocarcinomes colorectaux. Le sous-groupe le plus fréquent concerne les tumeurs qui se forment au niveau des glandes de Lieberkühn. Les autres sous-groupes sont plus rares (l'adénocarcinome mucineux et les adénocarcinomes dits à cellules en bague à chatons). Nous nous concentrerons dans étude sur la forme la plus répandue.

2.1.Type de cancer colorectal :

Dans la totalité des cancers colorectaux La plupart des cancers sont sporadiques (90% des cas), mais il existe également deux forme issue de susceptibilités génétiques héréditaires : la polypose Adénomateuse familiale (FAP) pour (Familial Adenomatous Polyposis) et le syndrome HNPCC pour (Hereditary Non Popyposis colon cancer) que nous développerons par la suite :

2.1.1. Les cancers sporadiques :

La majorité des cancers colorectaux sont de type sporadique dont 70 à 80% présentent une mutation du gène *Apc* (Adenomatous Polyposis Coli) gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 5, alors que 15% des cas sont touché par des mutations des gènes *MMR* (MisMatch Repair system) qui entraînent un dysfonctionnement de gènes codant pour des enzymes de réparation d'ADN (Figure 02) (**Rex DK. et al., 2009**).

2.1.2. La polypose Adénomateuse Familiale (PAF) :

Ce type de cancer se manifeste par un nombre élevé d'adénomes dans le colon et le rectum. Sont phénotype commence généralement à apparaître à l'âge de 20 et 30 ans avec un risque de 100% de développé une tumeur colorectal. Sont origine est due à une mutation du gène suppresseur de tumeur le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*). (**Bon JH. et al., 2000; Barrow et al., 2013; Jaspersen et al., 2010**).

2.1.3. Le syndrome de Lynch (syndrome HNPCC) :

Le syndrome de Lynch est la forme la plus fréquente de prédisposition aux cancers du colon, il est dû à la transmission autosomique dominante des mutations du gène *MMR* (Figure 03). Il représente 2 à 7 % des cancers colorectaux (**Bon JH, et al 2000; Hitchins, 2013; Kang et al., 2015**). Le syndrome de Lynch est aussi associé à un risque augmenté de survenue d'autres cancers (endomètre, intestin grêle, bassinet et voies urinaires, estomac, ovaires, etc.....) (**Vasen et al., 2010; Stoffel et Boland, 2015**).

2.2.Histoire naturelle du cancer colorectal :

Le renouvellement perpétuel de l'épithélium colique maintient physiologiquement un équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire. La transformation néoplasique survient lors d'une dérégulation de ces mécanismes au profit de la prolifération cellulaire entraînant le développement d'un cancer passant par différentes étapes:

2.2.1 Foyer de cryptes aberrantes :

Les Foyer de cryptes aberrantes (ACF, *aberrant crypt foci*) sont les premières anomalies décelables présentant une hyperprolifération de l'épithélium colique, formant ainsi des cryptes au calibre élargi entourées d'un épithélium épaissi avec une muco sécrétion diminuée, ces FCA existent sous la forme : (**Pretlow et al., 1992**).

- **Hyperplasie** : Prolifération anormale des cellules dans un tissu.
- **Dysplasie** : Caractérisée par des anomalies cellulaires, nucléaires et cytoplasmiques associées à des anomalies architecturales des glandes, dans le côlon. La dysplasie est caractérisée par une stratification des noyaux, des mitoses dans les deux tiers supérieurs des cryptes et une raréfaction des cellules caliciformes qui représentent 5% des FCA (**Neuville, 2010**)

2.2.2. Adénomes :

Les adénomes sont des lésions qui peuvent évoluer vers un carcinome, ils peuvent être classés selon deux critères : l'histologie et le degré de dysplasie. La prévalence des adénomes augmente avec l'âge et atteint 30% chez des sujets de 65ans. La plupart des CCR sont des adénocarcinomes et se développent à partir d'un adénome. 5% des adénomes progressent vers un cancer et la durée de la séquence adénome- carcinome est en moyenne de 10 à 15ans. (**Neuville, 2010**). Mais il reste de durée variable selon les différents cancers (**Carethers et**

Jung, 2015). Il survient en raison de l'accumulation de mutations dans certains gènes. C'est un processus multiphasique, qui comprenant quatre phase essentielles : l'initiation, promotion, et la progression et invasion (**Vogelstein et Kinzler, 1993**).

2.2.3. Adénocarcinome in situ :

Le développement d'un carcinome est d'abord superficiel, strictement intra épithélial puis intra muqueux sans franchissement de la lame basale est désigné sous le terme in situ stade précoce de cancer (**Neuville, 2010**). Certains carcinomes acquièrent la capacité de ce disséminer et de former des métastases à distance. Dans 75% des cas, les CCR métastasent au niveau du foie. Les autres localisations sont pulmonaires, osseuses ou cérébrales (**Carethers et Jung, 2015**).

2.2.4. Les métastases :

Une des caractéristiques majeures du cancer est sa capacité angiogénique lui permettant de se propager dans l'organisme. Certaines cellules tumorales vont quitter leur site d'origine (la tumeur primaire) pour se loger dans un autre organe et former une métastase (tumeur secondaire) (**Geiger et Peeper, 2009**). La formation des métastases suit le processus multi-étapes suivant (**Labelle et Hynes, 2012**):

- Détachement du support original et de leurs cellules voisines en perdant leurs propriétés d'adhérence;
- Franchissement de la lame basale qui délimite l'épithélium en digérant les protéines qui la constituent à l'aide de protéases pour envahissement des tissus voisins ;
- Intravasation dans la circulation sanguine ou dans la circulation lymphatique
- La survie lors du transit dans la circulation sanguine (résister aux forces physiques du flux sanguin et échapper aux cellules circulantes chargées de la surveillance immunitaire)
- L'arrêter sur la paroi des vaisseaux sanguins (arrêt initial) et la traverser l'endothélium (extravasation) pour gagner l'organe où elles s'implanteront ;
- Retour des propriétés d'adhérence sur un support afin de permettre l'ancrage d'une nouvelle tumeur dans le site secondaire (domiciliation secondaire ; survie et proliférer dans le tissu cible afin de former une micrométastase, induire une néoangiogénèse pour se développer (macrométastase).

2.3. Phases de développement tumoral :

2.3.1. Phase d'initiation :

La phase d'initiation résulte d'altération du matériel génétique de la cellule, stable et transmissible aux cellules-filles, conférant ainsi un caractère irréversible à ce premier stade du processus cancérogène. Ces lésions d'ADN interviennent spontanément à la suite de mécanismes endogènes ou produites à travers l'exposition à des agents cancérogènes. Deux mécanismes importants sont responsables de ces lésions : la métabolisation des agents chimiques en composés génotoxiques, et la défaillance des systèmes de réparation de l'ADN.

Parmi les lésions génétiques, deux classes de gènes sont responsables de l'apparition du cancer et de la prolifération cellulaire incontrôlée, les oncogènes qui stimulent la croissance cellulaire, et les gènes suppresseurs de tumeurs qui l'inhibent (**Stanley, 1995**).

2.3.2. Phase de promotion:

La phase de promotion, phase intermédiaire, voit le passage de la cellule initiée d'un état phénotypiquement normal, qui peut durer des années, à un état néoplasique prolifératif. Cette étape est induite par différents facteurs (chimiques, physiques) présents en quantité suffisamment importante pour provoquer l'expression de la mutation. Les substances promotrices présentent de manière générale une absence de pouvoir cancérogène ce sont principalement des mécanismes épigénétiques impliquant les voies de signalisation cellulaire et de communication intracellulaires qui interviennent au cours de cette étape (**Decloitre et Puiseux-Dao, 1993**). Cette phase est réversible, tout au moins à ses débuts.

2.3.3. Phase de progression :

La phase de progression est faite par l'acquisition définitive de la malignité qui aboutit à la tumeur proprement dite. Cette étape est irréversible et se caractérise par une grande instabilité génomique.

2.3.4. Phase d'invasion :

Phase de dissémination, des cellules tumorales migrent de leur organe d'origine vers d'autres tissus et forment ainsi des métastases à distance.

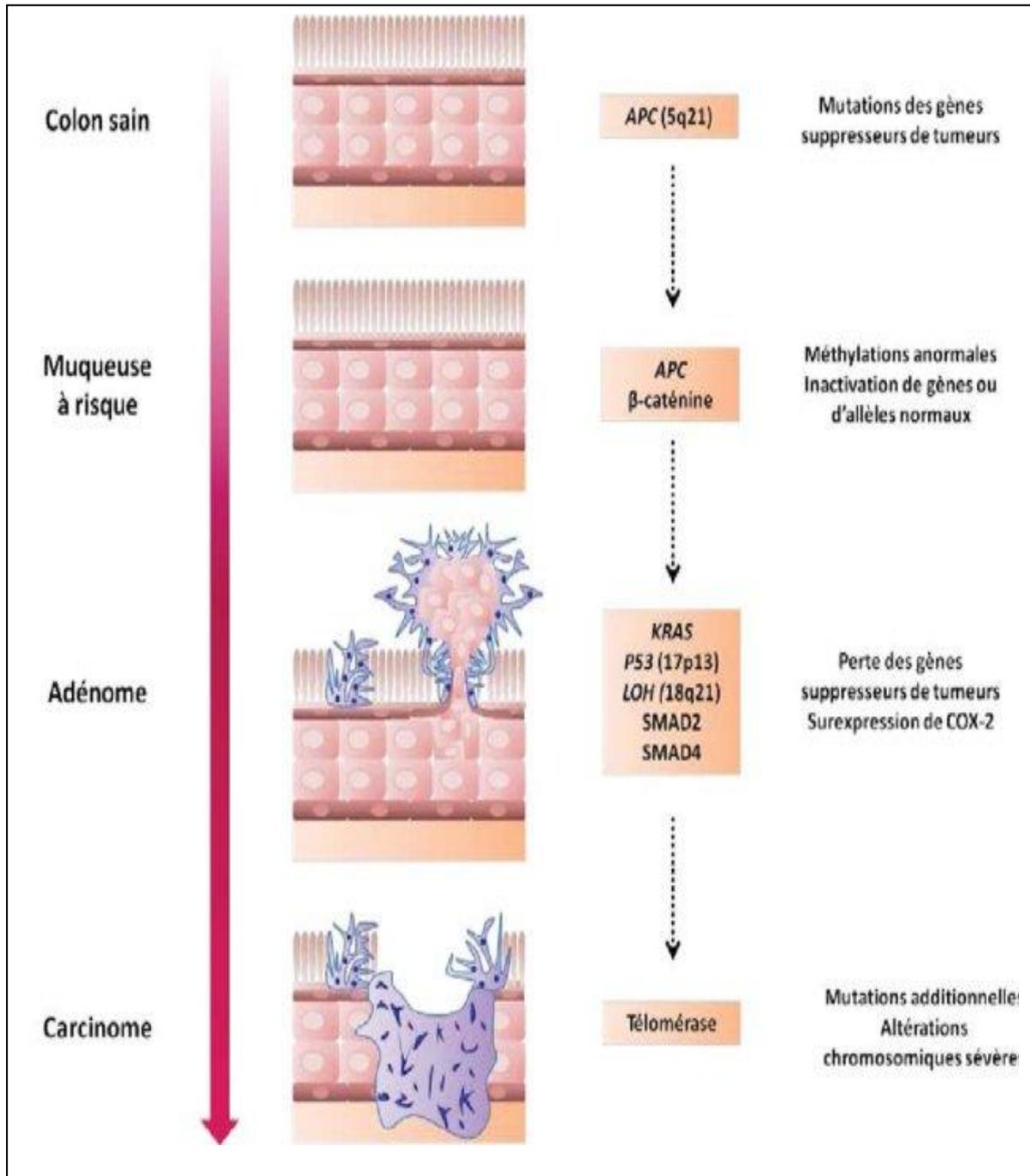


Figure N°2 : Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique. Modifié d'après (Bhalla et al., 2018)

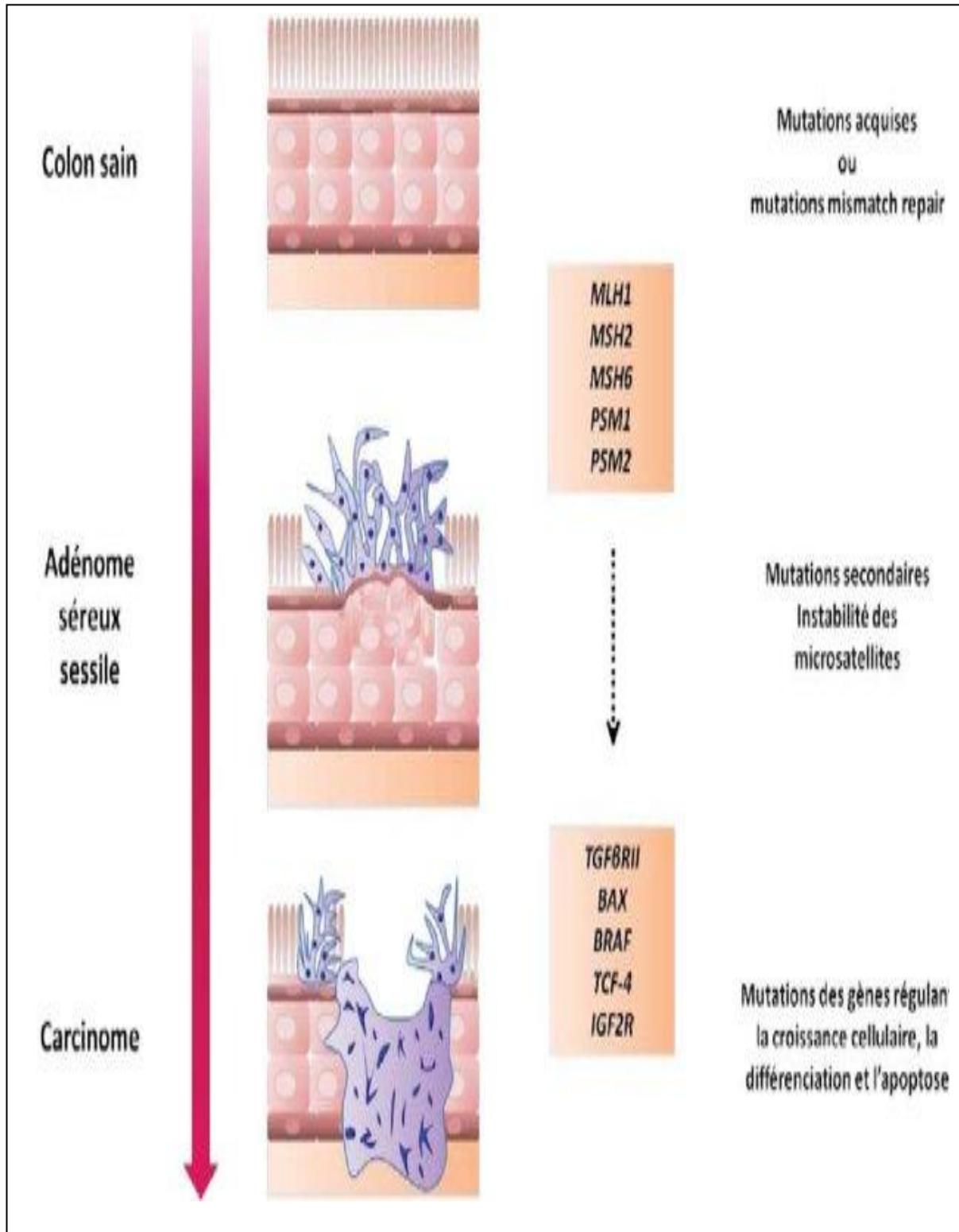


Figure N°03: Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire. Modifié d'après (Bhalla et al., 2018)

2.4. Propriétés et caractéristique de la tumorigénèse :

Les mécanismes de tumorigénèse passent par l'acquisition d'un certain nombre de propriétés, notamment : une prolifération incontrôlée, l'invasion des tissus adjacents et la colonisation des organes à distance. L'acquisition de ces caractéristiques correspond à la transformation par des altérations génétiques successives qui conduisent à la tumorigénèse. Selon Weinberg, les cellules tumorales provoquent les mécanismes suivants : l'échappement à l'apoptose, l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de la croissance, l'apparition d'un potentiel répliatif illimité, la capacité à induire l'angiogénèse et l'invasion tissulaire et l'activation des processus métastatiques (Figure 04) (Hanahan et Weinberg, 2000) :

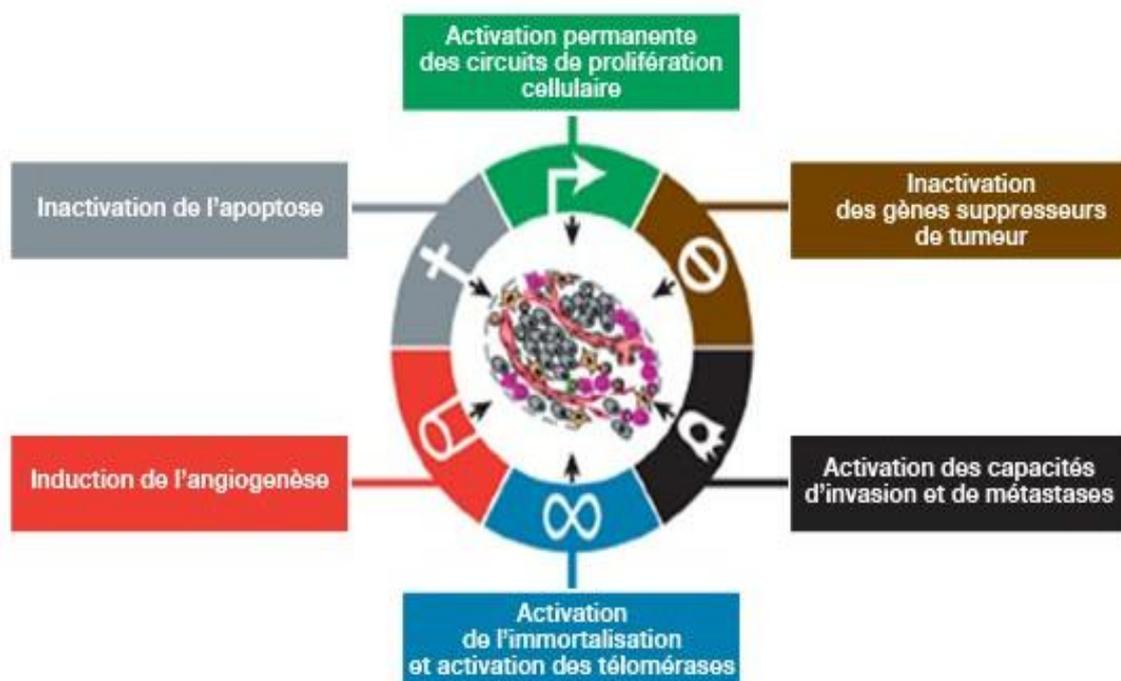


Figure N° 04: Propriétés et Caractéristique de la tumorigénèse (Hanahan & Weinberg, 2000).

2.4.1. L'autosuffisance en signaux de croissance :

Les tumeurs produisent leurs propres signaux de croissance pour proliférer en dépit des contrôles de l'organisme, et ainsi ne pas dépendre totalement de son microenvironnement (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

2.4.2. L'insensibilité aux signaux inhibant la croissance :

La prolifération des cellules est contrôlée au niveau du cycle cellulaire. Il existe des signaux qui bloquent le cycle cellulaire. Les cellules tumorales doivent échapper à ces signaux afin de proliférer (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

2.4.3. Potentiel répliatif illimité :

Les cellules tumorales bien qu'elles sont dotées de capacités répliatives élevées, les cellules finissent toujours par arrêter de se multiplier par un mécanisme de sénescence. Celui-ci semble être en partie dépendant de l'érosion des télomères qui progresse au fur et à mesure des cycles de divisions. Une des caractéristiques des cellules tumorales est de limiter l'érosion des télomères et d'échapper ainsi aux mécanismes de sénescence. Cela permet aux cellules tumorales d'avoir la capacité de proliférer indéfiniment (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

2.4.4. Echappement à l'apoptose :

L'expansion d'une population cellulaire tumorale ne dépend pas que de la prolifération mais à l'inhibition de l'apoptose. Les tumeurs deviennent insensibles aux signaux initiant ce mécanisme (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

2.4.5. Induction de l'angiogénèse :

Les cellules tumorales nécessitent un apport en oxygène et en nutriments afin de survivre. Cet apport se fait par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Lorsque la tumeur devient volumineuse, elle nécessite une irrigation plus importante. Elle doit être capable d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par mécanisme d'angiogénèse (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

2.4.6. Invasion des tissus et métastases :

Lors du développement tumorale, des cellules se détachent de la tumeur qui vont être à l'origine de la formation des tumeurs dans d'autres organes, par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins néo-synthétisés (**Hanahan & Weinberg, 2000**).

3. Les gènes ciblés dans les cancers :

La tumorigénèse initiée par l'ensemble des altérations génomiques (mutations ponctuelles, altérations du nombre de copies de gènes, translocations, modifications épigénétiques conduit à l'apparition de mutations activatrices sur un gène oncogène ou bien par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Figure 05)(Fearon, 2011; Vogelstein *et al.*, 2013).

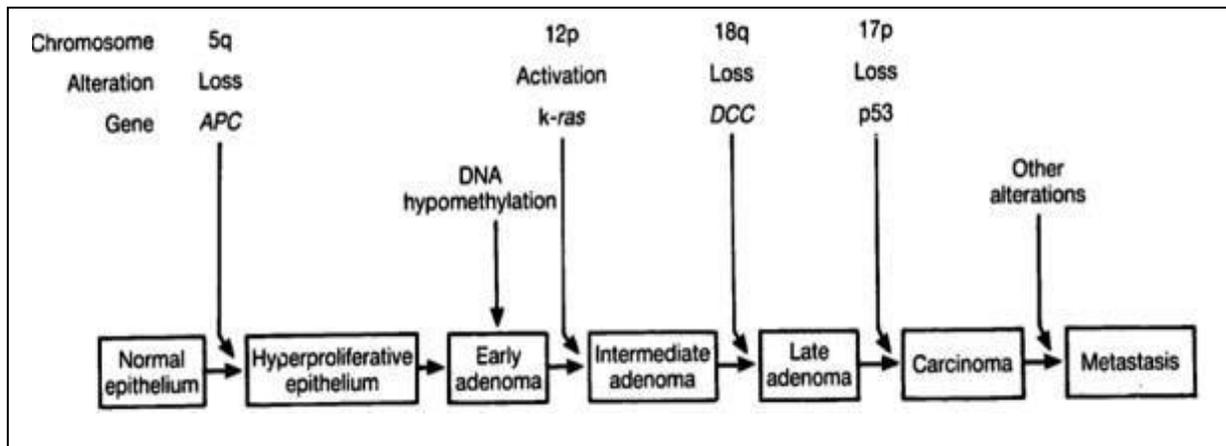


Figure N°05: Modèle génétique de la tumorigénèse colorectale
(Fearon et Vogelstein, 1990)

3.1. Les oncogènes :

Les Proto-oncogènes sont des gènes qui, une fois mutée ou défectueux ils deviennent oncogènes. Ces mutations peuvent être d'origine héréditaire ou causées par une exposition à un agent carcinogène dans l'environnement.

Les oncogènes sont une catégorie de gènes dont l'expression favorise la survenue de cancers par la synthèse d'oncoprotéines, protéines stimulant la division ou la différenciation cellulaire ou inhibant la mort cellulaire programmée, ce qui déclenche une prolifération désordonnée des cellules (Boland et Goel, 2010).

3.2. Les gènes suppresseurs de tumeur :

Un gène suppresseur de tumeurs ou encore anti-oncogène est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Ces gènes sont aptes à inhiber la croissance cellulaire et induire l'apoptose ou mort cellulaire programmée, désactivant ainsi la prolifération des cellules cancéreuse (Boland et Goel, 2010).

4. Les bases moléculaires du cancer colorectal :

La cancérogénèse colorectale résulte d'un processus d'initiation et de transformation de cellules normales suite à l'accumulation de modifications génétique et épigénétique clonales conférant aux cellules tumorales un avantage sélectif en termes de croissance et de prolifération (Figure 06)(Carethers et Jung, 2015).

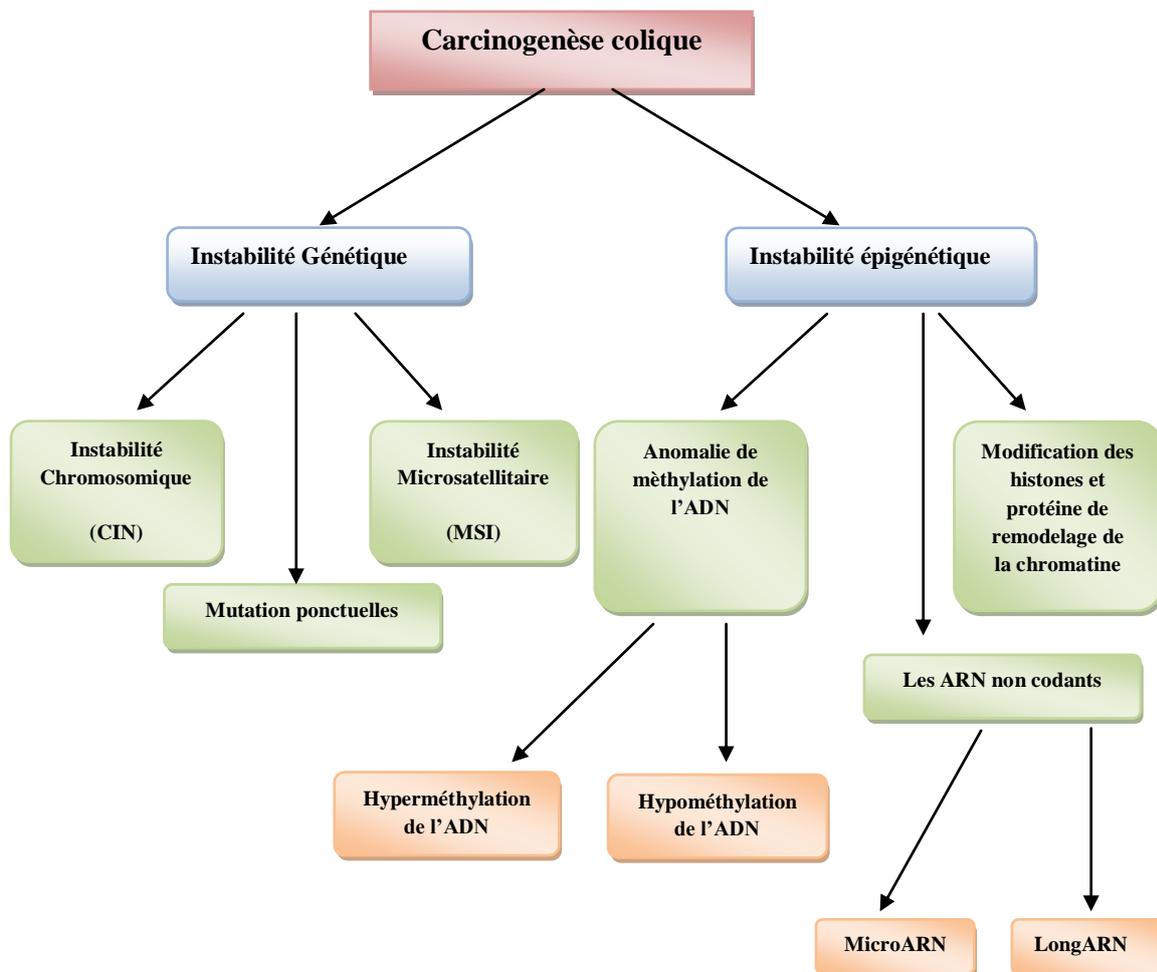
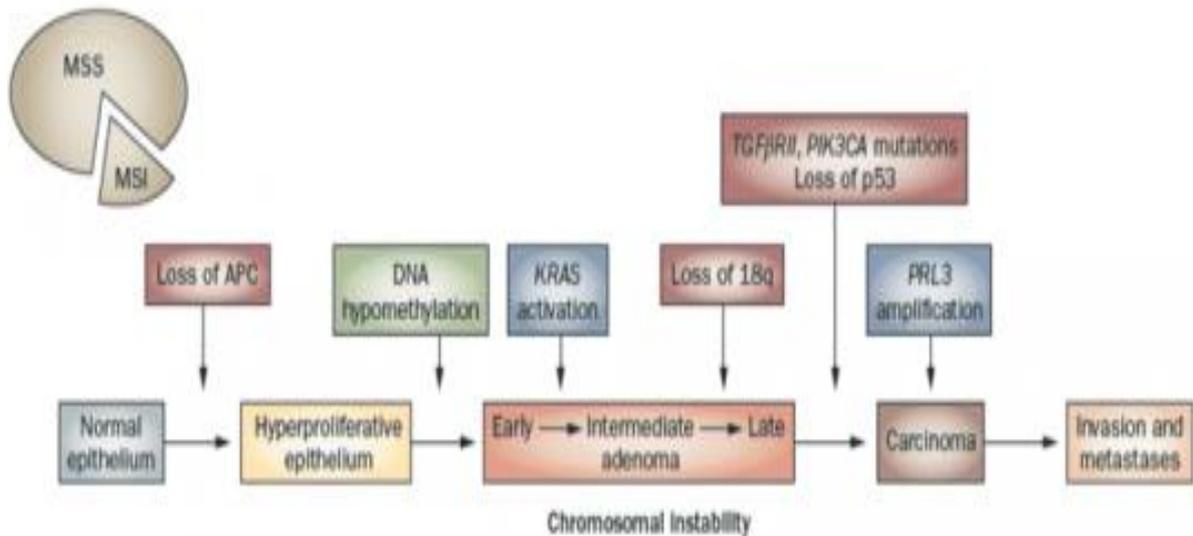


Figure N°06: Schéma récapitulatif des bases moléculaires du cancer colorectal

4.1. Instabilité génétique :

Les cancer colorectaux sont caractérisés par deux grandes formes d'instabilité génétique: l'instabilité chromosomique (CIN, *chromosomal instability*) et l'instabilité microsatellitaire (MSI, *microsatellite instability*) (Figure 07)(Lengauer *et al.*, 1997). Celles-ci sont associées à la présence de mutations ponctuelles dans divers proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur.

A



B

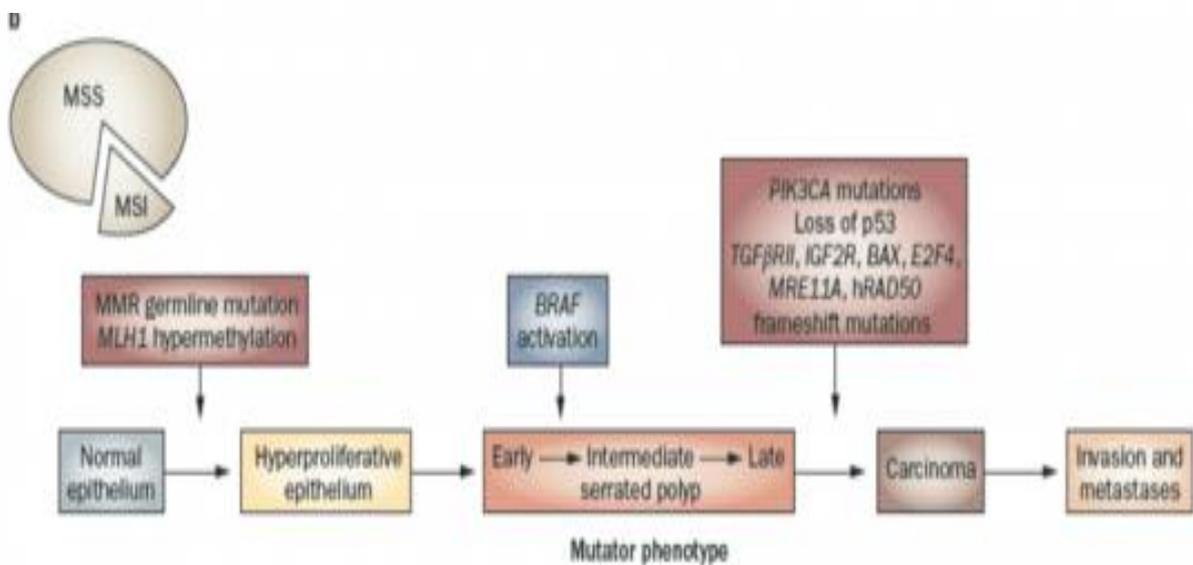


Figure N°07: Les deux principales voies de carcinogénèse colorectale. **A)** voie CIN; **B)** voie MSI. (Vilar E, *et al.* 2010).

4.1.1. Instabilité chromosomique :

L'instabilité chromosomique est détectée dans 80% des CCR. Elle se caractérise par une aneuploïdie (le plus souvent une polyploïdie), associée à la présence de pertes et de gains de fragments chromosomiques lors du phénomène de mitose. Ces CCR sont caractérisés en particulier par des pertes alléliques sur le bras court des chromosomes 17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 5, 18 et 22 (**Lengauer et al., 1997**). Ces pertes alléliques sont associées à des mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeur *APC*, *TP53*, *SMAD2* et *SMAD4*. Ainsi que de nombreuses mutations activatrices d'oncogène. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette instabilité chromosomique sont largement incompris.

L'altération du gène *APC* pourrait favoriser les anomalies de ségrégation chromosomique et sont considérée comme un événement initiateur de carcinogénèse du CCR, (**Fodde et al., 2001**). D'autres mutations sont également fréquemment retrouvées, comme la mutation secondaire du gène *KRAS* qui favorisera la progression tumorale ou l'acquisition de mutation dans les gènes *P53*, *PIK3*, *TGF- β* .

En outre, des altérations supplémentaires seraient alors nécessaires pour provoquer l'instabilité chromosomique, telles que des anomalies touchant les gènes impliqués dans le contrôle du fuseau mitotique lors de la division cellulaire comme *BUB1* (*Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 Homolog*), des anomalies du nombre et de la fonction des centrosomes, ou encore l'amplification du gène *AURKA* (*Aurora Kinase A*) (**Cahill et al., 1998 ; Killian et al., 2007 ; Nishida et al., 2007**).

D'autre part, Dans le CCR les amplifications et réarrangements de gènes sont rares, contrairement à de nombreux autres cancers (**Leary et al., 2008**).

4.1.2. Instabilité microsatellitaire :

L'instabilité microsatellitaire résulte de la défaillance du système de détection et de réparation de mésappariement des bases de l'ADN appelé le système MMR (Mismatch Repair). Son rôle est de reconnaître les erreurs produites par l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN sur le brin néo-synthétisé et de les réparer pour éviter la transmission d'information génétique erronée pouvant être responsable d'une instabilité génomique. Elle représente Environ 15% des CCR sporadique et 2 à 5% des CCR héréditaire, lorsque le système MMR est défaillant, il entraîne un phénotype tumoral particulier appelé : « phénotype RER » (Replicative Error) ou « phénotype d'MMR » (déficient MMR) ce phénotype va se traduire par un défaut de production de protéines MMR et une instabilité de séquences hautement répétées du génome, les microsatellites « phénotype MSI » (*microsatellite instable*). Ces mutations, correspondant à des délétions ou insertions de quelques nucléotides. On considère que l'inactivation d'un gène MMR n'est pas transformante en elle-même, mais que c'est l'accumulation de nombreuses mutations au niveau de gènes cibles d'instabilité qui est responsable de la transformation néoplasique (**Hamelin et al., 2008**). Parmi ces gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire, sont identifiés des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (*TGFBR2*), l'apoptose (*BAX*), la réparation de l'ADN (*MSH3*, *MSH6*), contribuant ainsi à la cancérogenèse (**Duval et Hamelin, 2002**).

4.1.3. Mutations ponctuelles :

Les principales mutations détectées dans le CCR sont des mutations inactivatrices des gènes *APC* (environ 75%), *TP53* (35 à 55%) et *PIK3CA* (environ 20%) et des mutations activatrices des gènes *RAS* (*rat sarcoma viral oncogene homolog*) (40 à 50%) (**Carethers et Jung, 2015**). Les mutations du gène *APC* sont le plus souvent des mutations tronquantes, tandis que les mutations du gène *TP53* sont généralement des mutations de type faux-sens. Des mutations oncogéniques de type faux-sens des gènes *KRAS* et *NRAS* sont détectées principalement au niveau des codons 12 et 13, et dans une moindre mesure au niveau du codon 61. Une mutation activatrice du gène *BRAF* est identifiée dans environ 10% des CCR, la mutation V600E étant de loin la plus fréquente (**Fearon, 2015**). Les mutations des gènes *RAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives (**Markowitz et Bertagnolli, 2009**).

4.2.Instabilité épigénétique :

Les modifications épigénétique correspondent à l'ensemble des modifications ayant un impact sur l'expression d'un gène, héritable lors de la division cellulaire (mitose ou méiose), mais ne résultant pas d'une altération de la séquence d'ADN (**Russo *et al.*, 1996**).

Ces processus modifient l'état de la chromatine, permettant l'accès de la machinerie de transcription et l'expression des gènes. Cette organisation est régulée notamment par la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, et les ARN non codants

4.2.1. Les anomalies de méthylation de l'ADN :

La régulation de l'expression des gènes passe par la méthylation de l'ADN qui correspond à l'ajout de groupements méthyl, ciblant les motifs CpG, habituellement regroupés en îlots au niveau du promoteur et en amont des séquences régulatrices des gènes. La méthylation de l'ADN est généralement associée à l'hétérochromatine et à l'inhibition de l'expression génique par répression transrationnelle.

➤ **Hyperméthylation de l'ADN:**

L'hyperméthylation de l'ADN est observé dans de nombreux cancers dont les CCR, qui contribue à l'instabilité chromosomique, dont l'hyperméthylation ciblée, qui inactive les gènes suppresseurs de tumeur (**Issa, 2004; Lao et Grady, 2011; Van Engeland *et al.*, 2011**).

➤ **Hypométhylation de l'ADN**

L'hypométhylation de l'ADN fait aussi partie des altérations épigénétique identifiées dans le CCR (**Goelz *et al.*, 1985**). Le génome d'une cellule tumorale subit en effet une perte massive et globale de méthylation d'environ 20 à 60% par rapport à une cellule normale (**Esteller *et al.*, 2007**). Cette hypométhylation résulterait d'un défaut de maintenance de la méthylation lors de la réplication de l'ADN. Ou un défaut d'expression d'enzymes (**Neri *et al.*, 2012**). L'hypométhylation est croissante tout au long de la séquence carcinogénétique (**Irizarry *et al.*, 2009; Van Engeland *et al.*, 2011**).

4.2.2. Modifications des histones et des protéines de remodelage de la chromatine :

les altérations et les modifications des histones et des protéines de remodelage de la chromatine induisent de nombreuses pathologies notamment cancéreuses (**Huang *et al.*, 2003** ; **Bhaumik *et al.*, 2007**). En particulier les histones H3 et H4, présentent des modifications covalentes au niveau de leur extrémité amino-terminale (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination) qui participent au contrôle de la dynamique chromatinienne en régulant les interactions entre nucléosomes et différentes protéines liées à la chromatine, et ainsi à la régulation de la transcription et à la stabilité du génome. (**Huang *et al.*, 2003**; **Bhaumik *et al.*, 2007**).

4.2.3. Les ARN non codants :

A l'inverse des ARN messagers issus de la transcription de gènes codants, les ARN non codants issus de la transcription de gènes à ARN n'ont pas vocation à coder pour des protéines. Il représente environ 80% du génome humain qui sont transcrit en ARN non codants (ARNnc), qui sont classés en petits ARNnc ou longs ARNnc selon leur taille (**Pauli *et al.*, 2011**). Les ARNnc jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'expression génique et leur dérégulation peut mener au cancer (**Taft *et al.*, 2010**; **Ryan *et al.*, 2010**).

➤ Les microARN :

Les microARN ou miR constituent une classe de petits ARN non codants d'environ 20 nucléotides qui contrôlent négativement l'expression d'ARN messagers cibles (**Ogier-Denis *et al.*, 2007**). La dérégulation de nombreux miARN a été démontrée dans différents sous-types de CCR. (**Aslam *et al.*, 2009**; **Okugawa *et al.*, 2015**).

➤ Les longs ARN non codants :

Les longs ARN non codants sont des ARN dont la taille peut varier de 200 à 100 000 nucléotides, qui jouent le rôle d'oncogènes ou des suppresseurs de tumeur. Comme les miR, de nombreux longs ARN non codants sont dérégulés précocement au cours de la carcinogenèse colorectale (**Han *et al.*, 2015**), parfois de façon spécifique selon le sous-type moléculaire (**Chen *et al.*, 2014**; **Qiu *et al.*, 2015**).

5. Les voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse colorectale :

La carcinogénèse résulte des défauts issus des différentes voies de signalisation impliquant plusieurs type de cancers, Dans le cas du CCR cinq voies de signalisation sont très fréquente quel que soit le type d'instabilité génomique impliqué: La voie Wnt/ β -caténine, EGFR/RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT, TGF β /SMAD, et TP53.

5.1.Voies Wnt/ β -caténine :

Dans 80% des cas sporadiques du CCR, le gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) est muté. En étant un gène suppresseur de tumeurs sa mutation est considérée comme le premier événement génétique intervenant dans la « séquence adénome-carcinome » de la cancérogénèse colorectale. Cette mutation précoce démontre que le gène *APC* est un initiateur de tumeur sporadique. Cependant, si sa mutation est suffisante pour initier la croissance d'une tumeur bénigne, elle ne suffit pas pour faire progresser cette dernière vers un stade plus avancé (**Powell et al., 1992**).

Le gène *APC* est localisé sur le chromosome 5q21 et code une protéine de 312 kDa. Constituée de plusieurs domaines qui lui permettent de fixer divers partenaires comme la β -caténine et les microtubules. Par ces liaisons, elle exerce un rôle à la fois direct dans la migration et l'adhésion cellulaire, mais également indirect, par la régulation de plusieurs gènes, dans la prolifération, la différenciation et le cycle cellulaire ainsi que dans l'apoptose. Dans l'épithélium colique normal, *APC* se concentre au sommet des villosités, au niveau des cellules matures qui subissent l'apoptose. Lorsque la protéine *APC* est exprimée sous sa forme mutée, généralement tronquée dans sa partie carboxyterminale, elle empêche la migration et l'apoptose des cellules, conduisant à une augmentation du nombre de cellules à la base de la crypte et entraînant ainsi la formation d'un foyer de cryptes anormales ou FCA. (**Morin et al., 1996**). La fonction principale d'*APC* est de réguler le taux cytosolique de β -caténine et cette régulation appartient à la voie de transduction du signal Wnt. qui pourrait jouer un rôle primordial dans la tumorigénèse colique (**Giles et al., 2003**).

5.2.Voies *EGFR/RAS/RAF/MAPK*:

Les EGFR (Epidermal growth factor receptor) ou HER1 sont des glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs de facteur de croissance à activité tyrosine-kinase HER ou ErbB. La fixation du ligand (tels EGF, TGF α) sur le récepteur entraîne sa dimérisation puis son activation par phosphorylation, permettant le recrutement de protéines de transmission des signaux intracellulaires comme SH2 (Src homology-2), puis l'activation en cascade de deux voies de signalisation d'aval RAS/RAF/MAPK et Voie PI3K/AKT.

La voie RAS/RAF/MAPK (mitogen activated protein kinase) via la protéine RAS. Le rôle de ces protéines est de relayer à un signal extracellulaire jusqu'au matériel génétique afin d'y exercer un rôle de répression ou d'induction transcriptionnelle. L'activation de la voie RAS/MAPK peut également être associée dans une faible proportion (environ 10%) à une amplification du gène EGFR (**Shia *et al.*, 2005**).

En outre, la mutation des gènes KRAS (Kirsten RAS viral oncogen homolog) et NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog), produise des protéines KRAS et NRAS étant situées en aval entraînant une activation constitutive de la voie de signalisation EGFR.

5.3.Voie *PI3K/AKT* :

La voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Cette voie est connue pour ses capacités à transmettre des signaux de survie et de croissance, mais elle participe également au profond changement du métabolisme glucidique par le biais de la sérine/thréonine kinase AKT. Cette voie agit via la protéine PI3K, impliquées dans la prolifération, la migration, l'adhésion et la différenciation cellulaire, ainsi que dans la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse. En situation physiologique, cette activation est transitoire (**Rajagopalan *et al.*, 2002**; **Samuels *et al.*, 2004**). Environ 10 à 30% des CCR ont une mutation sur l'un des acteurs de la voie PI3K/AKT (**Samuels et Ericson, 2006**; **Whitehall *et al.*, 2012**).

5.4.Voie *TGF-β/SMAD* :

Les TGF- β (*Tumor Growth Factor beta*) comprend une superfamille de plus de 30 membres. Ils sont des morphogènes dont le rôle est essentiel au cours de l'embryogenèse (Massagué, 2008). Leurs effets dépendent de l'intensité et de la durée des signaux induits via leurs récepteurs (Schmierer et Hill, 2007). L'une de leur fonction essentielle chez l'adulte, en particulier au niveau de l'épithélium digestif, est une inhibition de la prolifération cellulaire par ralentissement du cycle cellulaire en phase G1 (Heldin *et al.*, 1997).

5.5.Voie *TP53* :

Le gène *p53* est suppresseur de tumeurs porté sur le chromosome 17, qui est le siège de fréquentes délétions chromosomiques dans le CCR (Baker *et al.*, 1989; Delattre *et al.*, 1989). Ces mutations sont les altérations les plus fréquemment trouvées dans les cancers humains dont plus de 75% dans les adénocarcinomes colorectaux (Kinzler et Vogelstein, 1996). Son rôle est la régulation de l'expression de certains gènes importants : dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose.

La perte de *p53* dans de nombreux cancers conduit à une instabilité génomique. De plus, plusieurs études ont montré que les mutations de ce gène suppresseur de tumeur interviennent tardivement dans la cancérogénèse colique et semble être responsable de la transition de l'adénome vers le carcinome (Baker *et al.*, 1989; Delattre *et al.*, 1989).

5.6.Voie *NF-κB* :

NF- κ B (nuclear factor-kappa B) est une protéine de la superfamille des facteurs de transcription impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Cette dernière est associée aux facteurs anti-apoptotiques. En effet, son activation par la libération de sa protéine inhibitrice (I κ B) déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau. Elle effectue donc un rétrocontrôle négatif de l'apoptose. Elle est impliquée dans de nombreux processus inflammatoires et carcinogénèse. Cette voie joue un rôle crucial en contrôlant le développement et le fonctionnement des organes lymphoïdes secondaires (Dejardin E., 2006). Comparé à des cellules normales, les cellules cancéreuses ont une activité NF- κ B très élevée, produite par la cellule cancéreuse elle-même ou par les cellules inflammatoires péri-tumorales (Guo X. *et al.*, 2007). NF- κ B peut être activé par plusieurs

voies, comprenant le stress cellulaire, des lésions de l'ADN, l'exposition au TNF α et de nombreuses voies carcinogènes (**Baldwin AS., 2001**).

6. Traitement du cancer colorectal :

Le type de thérapie à entreprendre dans le CCR dépendra de l'état général de santé, de sa localisation, ainsi que du type et du stade du cancer (Annexe N°: 01). Les différents traitements sont :

6.1.La chirurgie :

La chirurgie est le traitement de première intention en cancérologie et reste très important pour la prise en charge thérapeutique. Toutefois, la place de la chirurgie a considérablement évolué à la fois dans le sens d'une contribution diagnostique éminente parfois exclusive mais aussi dans son adaptation aux autres thérapeutiques oncologiques (**Daly-Schweitzer N., 2011**). Son objectif est de réaliser une ablation de la tumeur et un curage ganglionnaire satisfaisant. Toute fois, la qualité de l'exérèse chirurgicale est un facteur pronostique de récurrence locale et de survie.

6.2.La radiothérapie :

La thérapie photodynamique est une modalité de traitement prometteuse pour la prise en charge des lésions cancéreuses et de diverses pathologies non oncologiques. Son principe repose sur l'action d'une molécule photoactivable, le photosensibilisateur (PS), qui s'accumule de manière préférentielle dans les cellules hyperplasiques et hyperprolifératives. Sous l'effet d'une irradiation lumineuse et en présence d'oxygène, ce PS génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ayant des effets cytotoxiques (**Daly-Schweitzer N., 2011**).

6.3.La chimiothérapie :

Le choix et l'efficacité des traitements anticancéreux médicaux dépendent du stade du cancer, à savoir son étendue. La chimiothérapie consiste à administrer au malade un médicament cytotoxique (toxique pour les cellules) destiné à la destruction des cellules cancéreuses. On parle d'une chimiothérapie adjuvante, lorsqu'elle est utilisée en complément à une chirurgie pour éliminer des cellules cancéreuses résiduelles après la chirurgie et donc d'éviter l'apparition d'une récurrence du cancer ou de métastases (**Lanore D. et Delpart CH., 2002**). Lorsqu'une chimiothérapie est dite néo-adjuvante, elle vise à réduire la taille du cancer colorectal avant une opération, tandis qu'une chimiothérapie palliative a pour but de ralentir

la croissance du cancer s'il n'est pas opérable et donc de prolonger la durée de vie ainsi que souvent d'améliorer la qualité de vie des patients en diminuant les symptômes liés à la tumeur (Lanore D. et Delpart CH., 2002; Laethan V., 2013).

6.3.1. Les effets secondaires de la chimiothérapie :

Malgré le développement rapide des moyens de traitement, La chimiothérapie reste encore imparable. Elle exerce une toxicité directe sur les cellules tumorales mais dès lors les cellules normales sont aussi touchées. Ce qui est à l'origine de nombreux effets indésirables (Marolla M. *et al*, 2008). Les effets secondaires des traitements oncologiques sont nombreux et très variés, leur survenu dépendant des molécules chimiques administrées, leur dose et l'état général. Parmi les effets indésirables reliés à la chimiothérapie les plus importants sont résumés dans le tableau N°01 (Burny L., 2010):

Tableau N°01: Effets indésirables des molécules utilisées en chimiothérapie

Effets indésirable	Molécules en cause	Prévention
Nausées, vomissements, Diarrhée	Oxaliplatine, 5-fluorouracile	Protocole anti-émétique, Lopéramide
Mycose buccale	5-fluoro-uracile	Remise en état de la dentition et bains de bouche.
Troubles neurosensoriels	Oxaliplatine, 5-fluorouracile	
Alopécie	Irinotécan, panitumumab	Port de casque réfrigérant. Réversible
Insuffisance rénale	Oxaplatine, oxaliplatine, Raltitrexed	Hyperhydratation avant et après la chimiothérapie
Rash	Oxaliplatine, Cétuximab, Panitumumab	Emollients, éviction solaire, toilette avec un pain dermatologique
Hypertension artérielle	Bevacizumab	Surveillance tensionnelle
Hématologie	Oxaliplatine	Erythropoïétine, G-CSF, fer, Transfusion
Oculaire, auditif	Oxaliplatine, Panitumumab	Hydratation oculaire

Chapitre II :

Les Marqueurs Tumoraux

1. Rappel historique des marqueurs tumoraux :

Historiquement, la découverte des marqueurs tumoraux commencèrent dès 1848 par la découverte d'une protéine urinaire qui précipitait lors du chauffage à 40°C et se redissolvait au-delà de 70°C lors du myélome, la protéine de Bence-Jones en 1936, suivit par la découverte des phosphatases acides utilisées dans la surveillance du cancer de la prostate. Puis la découverte en 1956, de l'alpha-fœtoprotéine (AFP) (**Bellet D., 2008**).

Concernant le cancer colorectal, Gold et Freedman sont les premiers à avoir observé une surexpression de l'antigène carcino-embryonnaire dans les cellules cancéreuses colorectales en 1965. Cependant, il aura fallu plus de quarante ans pour que l'utilisation clinique de ce marqueur soit recommandée de façon consensuelle par les sociétés savantes. D'autres marqueurs que l'ACE ont été découverts de la même façon (**Bellet D., 2008**).

En 1975 sont apparues les techniques des anticorps monoclonaux (AcM) permettant la caractérisation de nombreux marqueurs tumoraux et le développement de leurs dosages (**Riedinger *et al.*, 2005**).

2. Définition des marqueurs :

Plusieurs définitions des marqueurs tumoraux sont connues à ce jour comme étant une entité caractéristique qui se mesure et s'évalue objectivement, et sert d'indicateur d'un processus biologique pathogénique ou de réponse pharmacologique. Jouant un rôle important dans le diagnostic précoce, donnant une valeur pronostique et prédictive, ou encore pour permettre de monitorer la maladie.

Plusieurs paramètres peuvent servir de biomarqueur comme les protéines, les hormones, les enzymes, ADN, ARN, ou encore cellules tumorales circulantes (**Oldenhuis CN., 2008; Mertelsmann R., 2011**).

D'autre les définit comme des molécules biochimiques qui peuvent être détectées dans le sang ou d'autres fluides corporels des patients porteurs de tumeurs malignes. Ils peuvent être spécifiques des cellules tumorales.

Récemment, les marqueurs tumoraux se définissent étant, des glycoprotéines de haut poids moléculaire utilisées pour surveiller la progression des cancers, évaluer la réponse d'un traitement et de pister les rechutes. Ils sont secrétés par la tumeur et présents dans le sang ou ils peuvent être dosés (**Lynn *et al.*, 2012 ; Mercadal., 2015**).

Longtemps débattue, la place des marqueurs tumoraux dans la prise en charge des cancers colorectaux est maintenant reconnue du fait des progrès récents dans la connaissance de la biologie des cancers.

3. Caractéristique des marqueurs tumoraux :

La qualité d'un marqueur biologique se juge sur sa spécificité, sa sensibilité et son caractère pronostique, Le marqueur idéal serait (**Prost P., 2002**) :

- Permet le dépistage et la détection de la maladie à un stade précoce (asymptomatique) ;
- Aide à l'établissement du diagnostic symptomatique, il devient plus intéressant s'il est corrélé à la masse tumorale et à la gravité de la maladie ;
- Permet de donner une valeur pronostique pré-thérapeutique ou après traitement ainsi témoin de sont l'efficacité ou l'inefficacité ;
- Permet de juger la qualité de l'exérèse chirurgicale d'une tumeur ;
- Permet de détecter une reprise évolutive de la maladie (récidive) ;
- Avoir un dosage fiable, sensible, facile à mettre en œuvre, suffisamment rapide et peu onéreux.

4. Intérêt clinique des marqueurs tumoraux :

4.1. L'intérêt dans le dépistage et la sélection des populations à risque :

Le dépistage permet la détection de la maladie chez les patients à des stades très précoces et encore curable. Généralement le test de dépistage doit pouvoir être appliqué à une large population, il doit être sensible et surtout très spécifique et avoir une prédictivité positive élevée (**Samalin-Scalzi E., 2009**). Actuellement, plusieurs marqueurs sont utilisés tel que (l'alphafoetoprotéine AFP, ACE, CA19,9 et ...) mais aucun marqueur sérique ne satisfait les conditions d'un dépistage pour les cancers du tractus gastro-intestinal. Cependant grâce à l'approche moléculaire de nouvelles méthodes de dépistage des cancers du côlon et du rectum ont vu le jour (**Laurent- Puig P., 1997**).

4.2. L'intérêt dans le diagnostic :

L'établissement d'un bon diagnostic a un moment précoce de la maladie constituent un point important pour les marqueurs tumoraux, sachant que l'efficacité diagnostic d'un marqueur est en rapport avec sa sensibilité et sa spécificité car il est utile si son élévation s'observe chez la majorité des personnes atteintes du cancer et peu dans d'autres pathologie malignes ou bénignes ou chez le sujet sain. De ce fait son augmentation est intéressante si elle est corrélée avec la présence de masse tumorale et à la gravité de la maladie (**Prost P. et al., 2002**).

4.3. L'intérêt dans le pronostic, le suivi thérapeutique et la détection des récidives :

Un marqueur doit être capable d'aider le médecin à juger le pronostic vitale du malade et de classer le stade d'avancement de la maladie, de suivre l'état du malade suite à la thérapie, et il doit également permettre de détecter une reprise évolutive de la maladie métastase ou récidive locale. Et sera plus intéressant lorsqu'il survient avant les premiers signes cliniques ou radiologiques pour permettre une prise en charge rapide, ainsi qu'il doit être témoin d'efficacité ou d'inefficacité d'un traitement (**Prost P. et al., 2002**).

5. Les marqueurs tumoraux du tube digestif disponibles :

La science d'aujourd'hui dispose de deux types de marqueurs selon leur site et technique de dosage : les marqueurs sériques et les marqueurs moléculaires

5.1. Les marqueurs tumoraux sériques :

Un marqueur sérique permet la recherche des marqueurs tumoraux dans le liquide biologique, basé sur des techniques variées, mettant en jeu les réactions immunologiques (antigène anticorps) à l'aide de traceur (radioélément, enzyme, luminophore).

Au départ, les premiers dosages employaient des immuno-réactifs à base d'anticorps polyclonaux qui étaient composés de nombreuses variétés d'immunoglobulines dirigées contre différents sites antigénique. Ces préparation polyclonales présentaient plusieurs inconvénients à cause des anticorps qui ne reconnaissent pas le même déterminant antigénique et ne présentaient alors pas tous la même spécificité pour la molécule à doser (**Dubois J-B., 2000; Toutou Y., 1988**). Aujourd'hui, après l'introduction de l'emploi d'anticorps monoclonaux résolvant le problème, les anticorps sont dirigés contre un unique déterminant antigénique permettant ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité des méthodes d'analyse (**Bolla M., 1989; Prost P., 2002**). Concernant le cancer colorectal plusieurs marqueurs tumoraux sont disponible et utiliser de nos jours :

5.1.1. Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) :

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) est une protéine oncofoetale synthétisée essentiellement chez le fœtus durant les 6 premier mois par (intestin, foie et pancréas). Décrite la première fois en 1965 par Gold et freedmana. L'ACE est une glycoprotéine monocaténaire d'une masse moléculaire de 200 kDa composée de 45% de proteine et de 55% d'hydrate de carbone et qui appartient à la superfamille des immunoglobulines dans le groupe des molécules d'adhésion et la reconnaissance cellulaire (**Hackbarth, 2010**). Il est secrété chez l'individu normal ou on le retrouve en faible concentration. Sont seuil de normalité est de 5µg/L et d'une demi vie de 6 à 8 jours (**Maldonado et al., 2000**). Il est synthétisé essentiellement par le tube digestif est peut ce trouver au pole apical des cellules épithéliale. Jouant un des rôles important dans les contacts cellulaire, l'adhésion a la matrice extracellulaire et dotée de propriété adhésive capable d'adhésion homotypique (ACE-ACE) ou hétéro typique ainsi que la régulation de la croissance cellulaire et l'acquisition de phénotype métastatique (**Hackbarth, 2010**).

5.1.2. L'antigène carbohydate 19-9 (CA19-9) :

L'antigène carbohydate CA 19.9 ou GICA (Gasto intestinal Carbohydate) à été décrit en 1979 par Kaprowski à partir d'une tumeur maligne du colon (**Gauche A. et Brand F., 2005**)

Le CA19.9 est une glycoprotéine d'une masse moléculaire de 200 à 800 kDa. c'est un antigène polysaccharidique définie par sa reconnaissance par l'anticorps 1116-NS-19.9 (**Rita et al.,2012**) obtenu à partir de cellules d'une lignée d'adénocarcinome colique humain (**Eche N. et al. 2001; Bellet D. et al., 1997**). L'épitope répétitif reconnu par l'anticorps est un dérivé sialylé, Lacto-N-fucopentane II, d'un pentasaccharide associé au groupe sanguin Lewis A, mais 7% de la population ne portent pas l'antigène du groupe Lewis A et n'expriment pas donc le CA19.9. Il conviendra donc sont utilisation avec ACE. Sont seuil de normalité est de 37 UI/ml et une demi vie de 1 à 9 jours (**Gaillard, 2002**), Le CA 19.9 est un ligand pour la molécule endothéliale d'adhésion leucocytaire, le CA 19.9 permet l'adhésion des cellules malignes à l'endothélium vasculaire et la dissémination hématogène des cancers exprimant cet antigène. D'autre part, il a été montré une corrélation entre l'intensité de son expression et la gravité du pronostic des cancers colorectaux (**Gauche A. et Brand F., 2005**). En outre, l'antigène carbohydate 19-9 (CA19-9) reste un marqueur important utilisé par certaine équipe dans le cancer colorectal pour le suivi d'un traitement pour prévenir des récidive en association avec l'antigène carcino-embryonnaire. L'intérêt porté au CA19-9 est justifié par sa nature biochimique différente de celle de l'ACE, ce qui en fait un marqueur potentiellement complémentaire (**Gauche A. et Brand F., 2005; Desbene C. et Gaillard O., 2013**).

5.1.3. L'Alpha fœtoprotéine (AFP) :

L'alpha fœtoprotéine (AFP) est une glycoprotéine fœtale sécrétée au cours du développement par les cellules du sac vitellin puis essentiellement par le foie jusqu'à la naissance et accessoirement par les cellules du tractus intestinal. Sa concentration sérique diminue après l'accouchement et sa synthèse est réprimée après la naissance (**Beaudeau J.L., 2008**), Découverte en 1957 par Bergstrand et Czar (**Loric S. et Moutereau O., 2008**).

L'AFP est d'environ d'un poids moléculaire de 69 kDa constituée d'une chaîne de polypeptide de 590 acides aminés, sont taux normal chez l'adulte est inférieur à 20 ng/ml avec une durée de vie de 4 à 6 jours (**Denis I., 2000**). L'AFP exerce différentes activités physiologiques comme transporteur, facteur de croissance cellulaire (**Christelle M., 2005**).

5.1.4. L'anticorps sérique anti-P53 :

Dés les années 1982, fut la mise en évidence des altérations fréquente du gène p53 lors des cancers humains, et depuis la détection de l'anticorps anti-p53 est devenu sujet de recherche. Les anticorps circulants anti-p53 sont spécifiques aux pathologies tumorales et ne sont jamais retrouvés chez les populations saines. L'anti-p53 est issu d'une réponse immune qui est corrélée avec l'existence d'une altération du gène p53 conduisant à l'accumulation de protéine p53 inactive dans les cellules tumorales. La protéine normale se trouve intranucléaire et non reconnue par le système immunitaire, lorsqu'elle est mutée, elle se retrouve au contact du système immunitaire, soit lors de nécrose tumorale ou par translocation à la surface des cellules. Ce contact se traduit par la formation d'auto-anticorps qui sont mis en évidence par un test ELISA (**Lubin R., 1998; Desgarandchamps F. et Soussi T.,2001; Hammel P. et Soussi T., 2000**).

Les anticorps anti-p53 présente un outil pour la détection précoce du cancer grâce à leur présence à des stades précoces de la maladie alors que le cancer n'est pas encore détectable avec les investigations d'imagerie ou d'endoscopie (**Lubin R., 1998**).

5.2. Les marqueurs tumoraux moléculaires :

Les techniques de biologie moléculaire sont plus spécifiques à cause de la biodisponibilité l'ADN transformé et altéré chez toutes les cellules tumorales du fait de leurs proliférations clonale (**Laurent- puig P., 1997**). Le dépistage permet dès lors la détection de la maladie chez des patients asymptomatiques, donc à un stade très précoce de la maladie encore curable (**Prost P., 2002**). Effectivement, les marqueurs moléculaires s'avèrent plus intéressante par l'analyse de l'ADN circulant dans le sang contenant de petite quantité d'ADN libre (ng/ml) dans le plasma ou le sérum facilement détectable. Connus depuis longtemps à travers des études et dont ces concentration augmente chez les sujets atteints de cancer.

La fabrication de cet ADN libre est d'origine tumorale pour la plupart des tumeurs solides dont le cancer colorectal. Cet ADN circulant a pu être affirmé d'une façon certaine par la reconnaissance d'altérations moléculaires identiques observées dans les tumeurs. Ce sont d'abord les mutations du gène KRAS qui ont été recherchées sur l'ADN circulant sanguin de patients atteints d'un cancer colorectal (**Rougier P. et al, 2005**).

La provenance de cet ADN circulant n'est pas claire (Apoptose, nécrose tumorale, relargage de micrométastases). Les mutations génétiques à rechercher sont complexes,

hétérogènes et intriquées. Dans le cas du cancer colorectal, 4 types d'anomalies ont été retenues comme marqueurs (**Lecomte T., et al. 2010**):

- La mutation des oncogènes (KRAS) et des gènes suppresseurs (TP53 et APC) ;
- Les atteintes des microsatellites;
- L'atteinte épigénétique de l'ADN, sous forme d'hyperméthylation des gènes promoteurs (septine 9);
- Les mutations de l'ADN mitochondrial.

Les ADN circulants ont pu en revanche apporter une contribution réelle pour établir un dépistage (cas de l'ADN méthylé), un diagnostic (cas de l'ADN mitochondrial) et également le pronostic (traceur pronostique de progression de cancer colorectal métastatique) et/ou prédire la réponse au traitement (mutation de l'oncogène Kras).

La recherche de mutations circulantes constitue une voie d'avenir en termes de prédiction de l'évolution et de la réponse thérapeutique dans le cancer colorectal (**Lecomte T., et al. 2010; Lefebure B. et al., 2009**).

5.2.1. Les mutations de l'oncogène KRAS:

L'analyse des mutations de l'oncogène KRAS se réalise par une simple prise de sang. Qui ce fait particulièrement intéressante car il existe une concordance quasi parfaite entre les prélèvements sur les tumeurs et l'analyse de l'ADN libre circulant de façon que environ 50% des cancers colorectaux présente une mutation de l'oncogène KRAS2 et cette altération surviennent tôt au cours de la cancérogénèse (**Ryan BM. et al.,2003; Lamoril J. et al., 2009; Lecrubier A., 2012**). Effectivement des études ont prouvé le rôle pronostique des mutations KRAS dans le cancer colorectal métastatique (**Di Fiore F. et Michel P., 2009**).

5.2.2. ADN Méthylé (Test Septine 9):

A travers l'étude des phénomènes épigénétiques souvent liés à la cancérogénèse et en particulier au CCR la recherche de nouveaux biomarqueurs a mis la lumière sur l'ADN hyperméthylé dans le sang ou le plasma sanguin. Cet ADN dont les tissus sains étant peu ou pas méthylé représente un test plasmatique intéressant mesurant l'ADN-méthylé d'un variant de la Septine 9 (test de Septine 9) qui permet de détecter des adénomes (polype) de plus 1 cm (généralement non cancéreux), est d'autant plus positif que le stade du cancer est avancé, et reste négatif chez les individus sains vérifiés par coloscopie (**Boudin B., 2013; Emile C., 2012**).

5.2.3. Les mutations de l'ADN mitochondrial :

Déjà connu depuis longtemps que les altérations de l'ADN mitochondrial joueraient un rôle important dans la cancérogénèse du fait des altérations de la chaîne respiratoire et de la modification du processus apoptotique secondaire à la production accrue des EROs (Espèce réactives de l'oxygène) (**Lievre A. et Laurent-puig P., 2005**). De ce fait, le génome mitochondrial reste particulièrement sujet aux mutations somatiques dont les taux à leur niveau sont d'environ dix fois supérieures à ceux constatés au niveau de l'ADN normal. De plus, les systèmes de réparation de l'ADNmt sont moins développés et moins efficaces que ceux de l'ADNn (**Chihara N. 2011**). A ce jour, les CCR ont fait l'objet de plusieurs études portant sur l'analyse du génome mitochondrial au niveau tumoral et montrent des taux élevés de mutations de la région codante de la D-Loop (Displacement-Loop), et plus particulièrement de la séquence mononucléotidique D310 dans ce cancer (**Samalin-scalzi E et Ychou M., 2009**). Par ailleurs a été constaté la survenue précoce de mutations de l'ADNmt, dès le stade de lésion précancéreuse. La mise en évidence de ces mutations au niveau du plasma des malades reste très possible due à la facilité de la détection de l'ADNmt dans les liquides biologiques, dès lors les mutations de la D-Loop pourraient donc constituer un marqueur moléculaire du CCR utile au diagnostic, mais également au suivi des malades sous traitement (**Lievre A. et Laurent-puig P., 2005; Chihara N. 2011 ; Samalin-scalzi E et Ychou M., 2009**).

5.3. Recherche de sang dans les selles :

Devant la gravité de la fréquence et l'évolution rapide du CCR, la méthode la plus simple qui a prouvé son intérêt de dépistage en diminuant le taux de mortalité la fameuse (recherche de sang dans les selles) le test Hemocult II ou test au guaiac (**Mandel JS., 2000**). Le principe de ce test est de mettre en évidence la présence d'un saignement occulte dans les selles. Quand il y a du sang dans les selles, la présence de peroxydase est révélée (**Guldenfels IC., 1990**).

Chapitre III :

Le Microbiote Intestinal

1. Le microbiote intestinal:

Le microbiote intestinal ou flore intestinale est un ensemble de microorganismes présent dans le tractus gastro-intestinal. L'être humain héberge (10^{14} bactéries/g) bactéries dans son tractus digestif soit environ 10 fois plus de microorganismes qu'il n'est constitué de cellules eucaryotes humaines (**Sasaki, M. et Klapproth J.M., 2012**).

La majorité du microbiote loge au niveau du colon (**Gill SR. *Et al*, 2006**) ce tropisme colique s'explique par ces caractéristique physicochimiques lui conférant le milieu favorable a sont développement dont : le pH, la faible concentration en sel biliaire, péristaltisme lent, le taux faible en cellule Paneth produisant des peptides antimicrobiens et peu de cellule cryptique au faible renouvellement permettant une colonisation plus stable (**Candela M. *et al*, 2007**).

L'analyse de sa composition a été rendue possible par l'arrivée des techniques de séquençage de l'ADN permettant ainsi de s'affranchir des limites de la culture. Cette avancée considérable en biologie moléculaire a permis une étude plus poussée du microbiote intestinal et a ainsi révélé son incroyable richesse. Le génome collectif des microbes du microbiote défini par le microbiome contient 2.85 Billion de paire de bases, 100 fois plus de gène que le génome humain (**Gill SR. *et al*, 2006**) et code des fonctions que le génome de l'homme seul n'est pas capable d'assurer (**Xu J. *et al*, 2007**). Cette association est le fruit d'une coévolution de l'hôte avec sa flore (**Ley RE. *et al*, 2008a; Ley RE. *et al*, 2008b**) à travers une relation symbiotique, mutualiste ou la flore exerce une influence importante sur le phénotype métabolique humain (**Martin FP. *et al*, 2007**).

1.2.Rôle du microbiote intestinal:

Le microbiote représente une énorme biomasse présentant de très nombreuses fonctions utiles à l'homme :

- Rôle de barrière contre la colonisation des microorganismes pathogène
- Exerce une influence nutritionnelle : fermentation, digestion des substrats, amélioration de l'efficacité de la capitation des aliments ingérés
- Synthèse de vitamine.
- Il intervient dans de nombreux autres processus physiologiques, comme la prolifération cellulaire intestinale, le maintien du pH, le développement du système immunitaire et la protection contre les pathogènes (**Kurokawa K. *et al*, 2007**).

Ces fonctions essentielles ont fait considérer le microbiote intestinal comme l'organe oublié du corps humain (**O'Hara AM. et Shanahan F., 2006**).

1.3. Phylogénèse du microbiote intestinal:

L'analyse phylogénétique du microbiote intestinal réalisé par amplification et séquençage de l'ADN codant la sous-unité ribosomale 16S des microorganismes. Démontre que le microbiote humain serait réparti selon 5 phyla (grand groupe) bactériens majoritaires : Les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, et Fusobacteria (Figure 08)

Les Firmicutes et Bacteroidetes représentent plus de 90% des bactéries (65% et 25% respectivement), Les Actinobacteria, Proteobacteria, et Fusobacteria sont des phyla sous-dominants (5, 8, et 1% respectivement) (**Rajilic-Stojanovic M. et al, 2007**). Il faut descendre à un niveau taxonomique inférieur pour mieux explorer la biodiversité bactérienne avec 1800 genres et 15000 à 36000 espèces ont été répertoriés à ce jour, sachant qu'une plus grande diversité resterait à découvrir (**Peterson DA. et al, 2008; Zoetendal EG. et al, 2008**).

Le microbiote intestinal varie de façon considérable d'un individu à un autre en termes d'espèces et de sous espèces (**Turnbaugh PJ. et al, 2007**). 70% des phylotypes identifiés dans le tube digestif sont spécifiques à un individu, et aucun phylotype commun à la population n'est générale représenté à plus de 0.5% (**Turnbaugh PJ. et al, 2009**). Ces différences sont relatives: A l'environnement auquel on est disposé depuis la naissance, exposition aux bactéries maternelles et pendant les phases initiales de la vie, ainsi que le patrimoine génétique de chaque individu définies des caractéristiques microbiennes singulières. Pendant sa croissance et son développement, la plupart des phylotypes sont continuellement présents et inchangés dans le tube digestif (**Zoetendal EG. et al, 2008**) de sorte que le microbiote peut être défini comme un noyau stable de colonisation microbienne autour duquel gravitent des visiteurs transitoires (**Turnbaugh PJ. et al, 2008; Flint HJ. et al, 2007**).

Cependant, malgré la grande variabilité d'espèces microbiennes interindividuelles, la représentation phénotypique de l'ensemble des gènes incorporés dans le génome bactérien varient peu d'un individu à l'autre du fait d'une certaine redondance fonctionnelle de ces différents gènes (**Peterson DA. et al, 2008**). De ce fait un microbiome central commun à tous les individus a été identifié (**Turnbaugh PJ. et al, 2009**). Cet ensemble de gènes code des fonctions métaboliques, dont le rôle est essentiel dans le maintien de la relation entre l'hôte et son microbiote. A côté de ce microbiome central, chaque individu possède également un microbiome fonctionnel variable, avec des gènes fonctionnels particulier et différent selon les individus (**Garrett WS. et al, 2010**). Il est important de savoir que des membres d'une même famille ont le plus souvent un microbiome fonctionnel variable dont la plus part des fonctions physiologie sont encore inconnu (**Turnbaugh PJ. et al, 2010**).

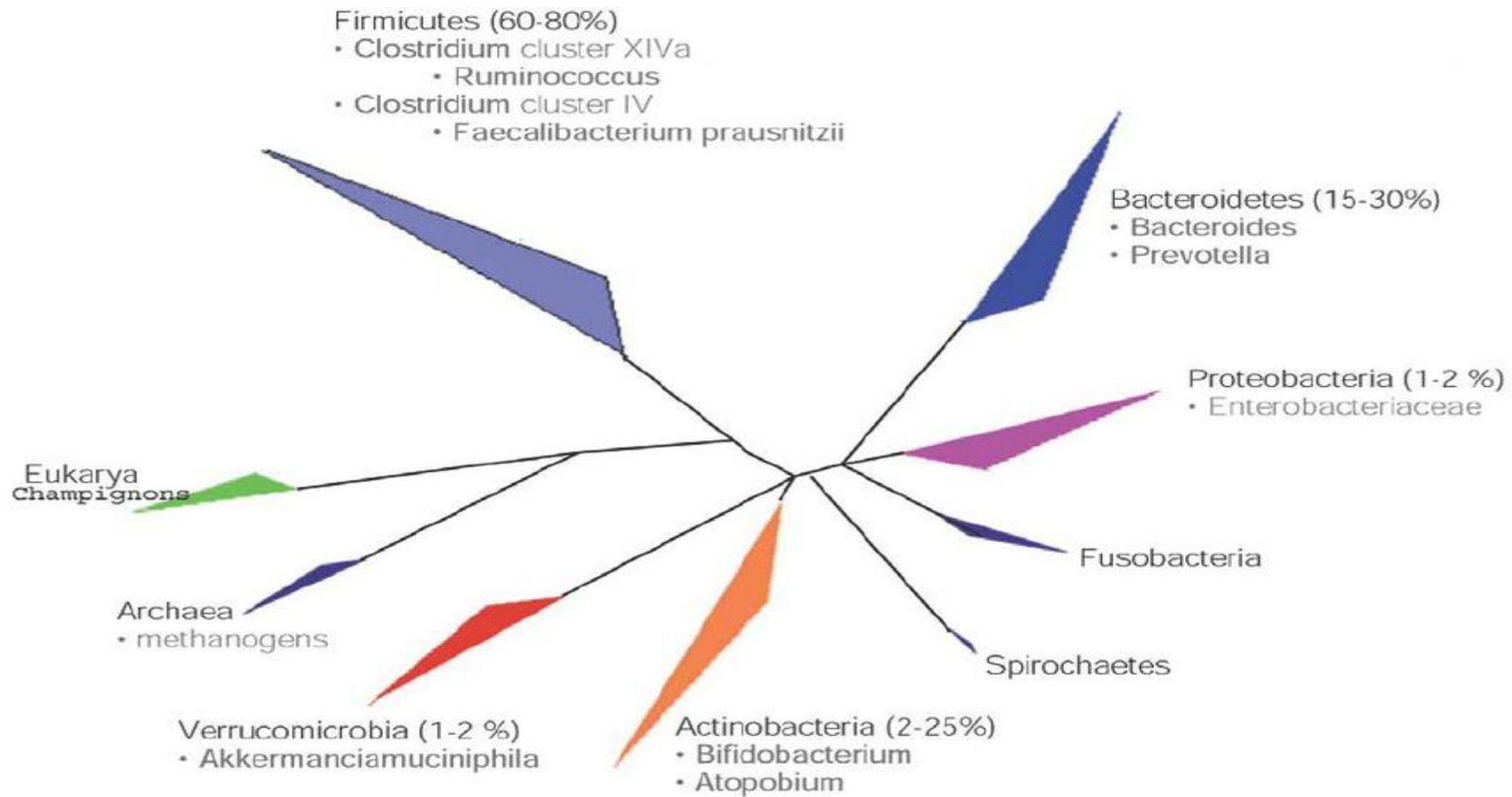


Figure N°08: L'arbre phylogénétique des bactéries du microbiote intestinal (Cheng *et al.*, 2013)

1.4. La barrière muquo-intestinale :

Le microbiote intestinale représente un élément essentiel de la barrière muquo-intestinale qui est un écosystème complexe constituée de flore intestinale, de mucus, d'une monocouche de cellules épithéliales, ainsi que des cellules immunitaires (McGuckin. *et al*, 2009).

La barrière intestinale permet l'absorption des nutriments tout en constituant une barrière efficace évitant l'entrée massive des antigènes alimentaires et des microorganismes commensaux. C'est également un lieu d'échantillonnage constant indispensable à la formation du système immunitaire pour initier la défense de l'organisme ou la mise en place d'une tolérance (McGuckin. *et al*, 2009).

L'épithélium intestinal se situe à l'interface entre la flore intestinale et le système immunitaire de la muqueuse. Outre ses fonctions d'absorption des nutriments, il est responsable de la production du mucus qui lui sert à la fois de barrière physique et chimique face aux agents bactériens (Figure 09) (McGuckin. *et al*, 2009; Roda G. *et al*, 2010) les cellules de l'épithélium intestinal forment une barrière physique entre le contenu de la lumière intestinale et le milieu interne notamment par la présence des jonctions serrées intercellulaires (Roda G. *et al*, 2010). En outre, La viscosité du mucus protège l'épithélium en limitant l'adhésion des microorganismes et la pénétration des toxines bactériennes (Swidsinski A. *et al*, 2007) Les différents éléments constituant le mucus notamment les immunoglobulines (IgA), les peptides antimicrobiens comme les défensives et les lectines assurent une activité antimicrobienne directe (Roda G. *et al*, 2010).

L'homéostasie intestinale est assurée à travers une interaction complexe entre le microbiote intestinal, l'épithélium intestinal et le système immunitaire de l'hôte. La muqueuse intestinale contient une population complexe de cellules immunitaires (les "T helper" : Th1, Th2, Th17 et les "Treg") qui sécrètent tout un éventail de cytokines. Cela inclut des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10 qui régulent négativement la réponse immunitaire mais également des cytokines pro-inflammatoires qui assurent la défense contre les micro-organismes pathogènes (Abraham C. and Cho J.H. ,2007). La phagocytose par les macrophages et la synthèse de peptides antimicrobiens par les cellules de paneth participent également à la défense contre les bactéries limitant ainsi les dommages tissulaires. L'équilibre entre les cellules "T helper" et les cellules Treg (donc entre cytokines pro- et anti-inflammatoires) est continuellement ajusté afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire intestinal (Abraham C. and Cho J.H. ,2007).

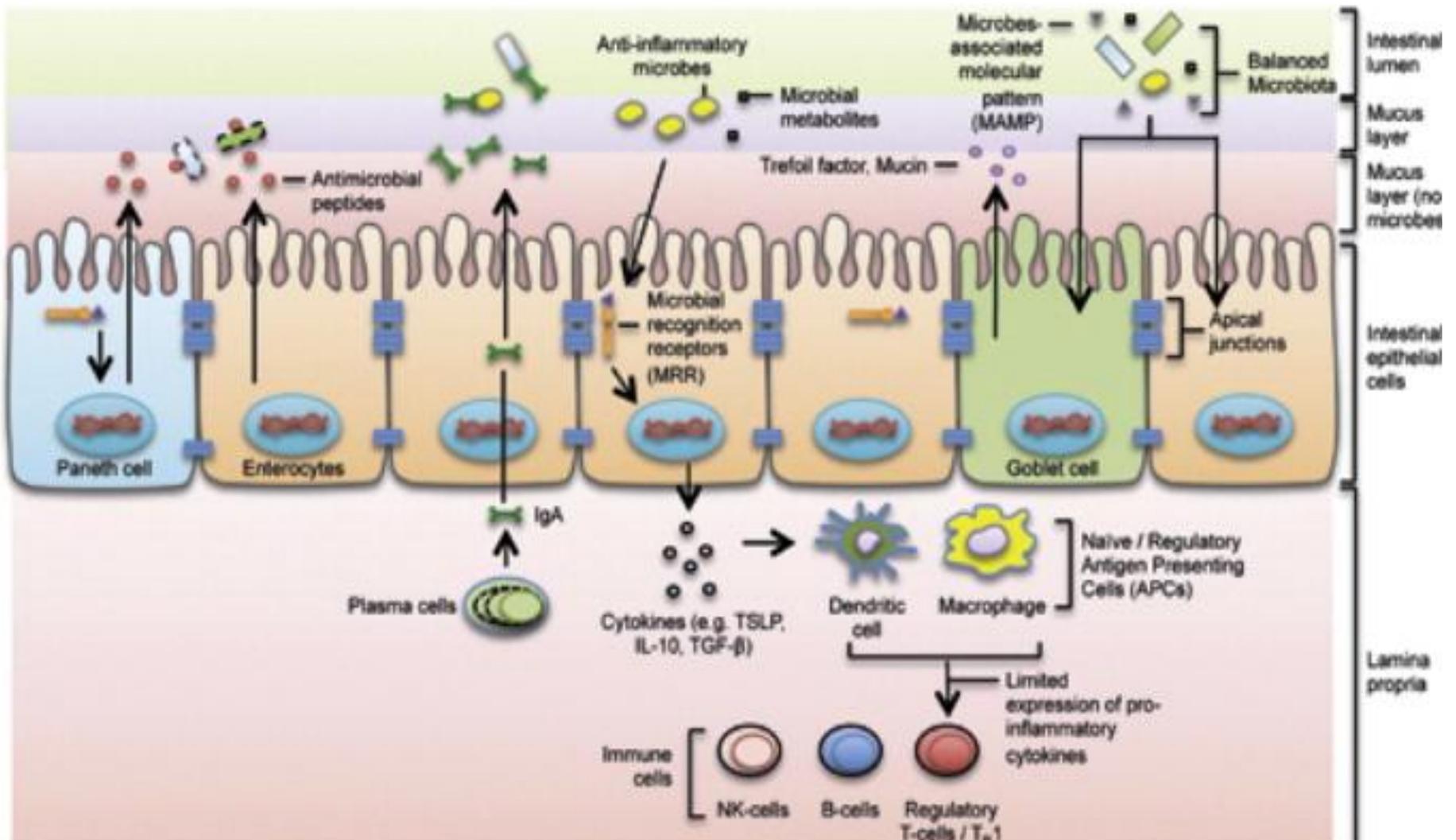


Figure N°09: L'homéostasie intestinale (Jane M.M *et al.*, 2013)

2. Facteur influençant la composition du microbiote :

La biodiversité du microbiote intestinal est en constante évolution, de nombreux facteurs liés à l'hôte influencent sa composition (Ge Z. *et al*, 2008): L'âge, l'état de santé, les facteurs environnementaux, localisation géographique, ethnie, la nourriture, peuvent impacter sur le microbiote en terme quantitatif et qualitatif.

2.1. Le régime alimentaire :

➤ L'alimentation est un point important dans la modulation du microbiote à travers les différents régimes, Il a été démontré que:

➤ Les régimes riches en fibres favorisent la croissance des microorganismes du symbiote par rapport aux autochtones opportunistes ou aux allochtones entéropathogènes (Gibson GR., 2008).

➤ le régime riche en graisses diminue la diversité du microbiote et augmente le taux d'*Actinobacteria* et de Firmicutes par rapport aux Bacteroidetes (Turnbaugh PJ. *et al*, 2009).

➤ le régime pauvre en graisses et riche en polysaccharides de plantes favorisent les échanges de nutriments entre Bacteroidetes et Firmicutes producteurs de butyrate. Cette interaction métabolique conduit à la production de butyrate au rôle fondamental dans l'homéostasie de l'hôte (Mahowald MA. *et al*, 2009).

➤ le régime pauvre en polysaccharidiques complexes diminue la production de butyrate et donne l'effet contraire (Mahowald MA. *et al*, 2009).

2.2. Les facteurs environnementaux :

La composition du microbiote intestinal est influencée par les réactions du système immunitaire vis-à-vis aux:

➤ Des maladies humaines non infectieuses caractérisées par une inflammation intestinale aberrante telles que les allergies, ou maladies d'origine environnementaux qui prédisposent à une perte d'antigènes intestinaux intraluminaux (McConnell BB. et Yang VW., 2009) conduisent à des activations pro-inflammatoires non contrôlées avec un impact majeur sur la composition du microbiote intestinal (Garrett WS. *et al*, 2010; Round JL. et Mazmanian SK., 2009). L'inflammation rompt l'homéostasie liée au microbiote intestinal en favorisant les bactéries pathogènes au détriment des microorganismes symbiotiques protecteurs (Sansonetti PJ., 2008).

➤ Des pathobiontes comme *Helicobacter*, certains *Clostridium* et *Enterococcus* sont des pathogènes opportunistes qui résident communément dans le tractus gastro-intestinal (**Round JL. et Mazmanian SK., 2009 ; Mazmanian SK. et al, 2008; Chow J. et Mazmanian SK., 2010**). Habituellement composants mineurs du microbiote des sujets en bonne santé, ces pathogènes opportunistes peuvent échapper à la surveillance dans un écosystème inflammatoire, prendre le pas sur les symbiontes et induire une pathologie (**Round JL. et Mazmanian SK., 2009**). En maîtrisant l'effet létal de la réponse inflammatoire, les pathobiontes se servent de l'inflammation pour éliminer l'effet barrière du microbiote, éventuellement rompre la barrière physique de l'épithélium et assouvir leurs besoins métaboliques (**Sansonetti PJ. et Di Santo JP., 2007**).

2.3. Les facteurs génétiques et maladies:

Le facteur génétique dument le développement de certaines maladie chez l'homme qui est associées aux modifications spécifiques du microbiote (**McKenna P. et al, 2009**), bien qu'il soit difficile de savoir s'il s'agissait de la cause ou de la conséquence. Des perturbations du microbiote ont été observées dans plusieurs maladie marqué par un état héréditaire (génétique) tel que l'obésité, le diabète de type II, la surcharge graisseuse hépatique (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease), et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) (**Neish AS., 2009; Rawls JF., 2007; Jia W. et al, 2008**). L'obésité a été associée à une plus importante proportion de Firmicutes et d'Actinobacteria par rapport aux Bacteroidetes et une diminution globale de la diversité bactérienne (**Turnbaugh PJ. et al, 2009; Jia W. et al, 2008**). Les MICI sont caractérisées par une réduction marquée de la diversité bactérienne dans les groupes IV et XVa de *Clostridium*, une diminution des Bacteroidetes, et une augmentation correspondante de Proteobacteria et *Bacillus* (**Sokol H. et al, 2008; Frank DN, et al, 2007**). De façon analogue l'inflammation intestinale à été généralement liée à une augmentation marquée des Entérobactéries et une diminution d'autant des membres de la flore résidente (**Stecher B. et al, 2004; Pedron T. et Sansonetti P., 2008**).

3. Interaction du microbiote intestinal :

3.1. Microbiote et hôte :

La relation entre le microbiote et son hôte commence dès la naissance en instaurant tout un système de reconnaissance par la régulation du système immunitaire à travers la capacité de différencier entre les pathogènes nuisibles des micro-organismes commensaux. Il faut donc un système immunitaire dynamique mais permissif qui puisse ajuster la réponse immunitaire en fonction du type de micro-organismes et du degré de danger (**Forstner JF. et al, 1995**) (Tableau 02):

Tableau N° 02: Différences entre l'interaction des micro-organismes commensaux et pathogènes sur leur hôte.

Micro-organismes commensaux	Micro-organismes pathogènes
➤ Les micro-organismes commensaux ne possèdent pas de facteurs de virulence.	➤ micro-organismes pathogènes possèdent un arsenal de facteurs d'adhésion et d'invasion
➤ Ils évoluent le plus souvent à distance des entérocytes protégés par le film de mucine	➤ Entrer en contact avec les entérocytes Essaye de pénétrer dans l'épithélium
➤ les bactéries commensales sont tolérées par une « inflammation constitutive physiologique de bas grade »	➤ Induisent une réaction immunitaire intense destinée à provoquer leur élimination

3.2. Le Microbiote et le système immunitaire :

La régulation du microbiote avec le système immunitaire est importante à différentes phases, lors de son installation, colonisation et interaction envers son hôte pour la protection, régulation, la gestion et l'élimination des germes pathogènes. Plusieurs facteurs entrent en jeu :

Le premier des acteurs de ce système immunitaire est l'épithélium intestinal qui évalue la proximité et la densité des micro-organismes résidents (**Sansonetti PJ. et Medzhitov R., 2009**). La reconnaissance des micro-organismes se fait par l'intermédiaire des récepteurs appelés PRR (pattern recognition receptors) qui reconnaissent spécifiquement des ligands macromoléculaires bactériens appelés MAMP (microbial-associated molecular patterns).

Les PRRs incluent 2 types de récepteurs : les Nod-like receptors (NLRs) et les Toll-like receptors (TLRs) (**Sansonetti PJ. et Medzhitov R., 2009**):

- **Les NLRs** : les Nod-like receptors, jouent le rôle de surveillance au niveau du compartiment intracellulaire. Ils sont recrutés soit par des MAMP dont l'entrée fait intervenir des protéines de transport situées sur le pôle apical de la cellule, soit par les bactéries elles mêmes lors de leur entrée dans la cellule.
- **Les TLRs** : les Toll-like receptors, sont des récepteurs transmembranaires surtout exprimés au niveau baso-latéral. Ils sont impliqués dans la sécrétion de cytokines et interviennent dans l'immunité cellulaire.

La distribution spatiale des PRRs permet aux entérocytes de différencier les microorganismes commensaux des pathogènes et régisse des interactions différentes vis-à-vis de la virulence des germes (**Sansonetti PJ, 2008**). L'activation de ces PRRs induit les voies MAPK et NF- κ B (Voir chapitre I: Cancer colorectal).

Effectivement, Les bactéries commensales comme *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Lactobacillus casei* sont capables d'inhiber l'inflammation en ciblant le médiateur NF- κ B dans réponse inflammatoire au niveau de l'entérocyte (**Kelly D. et al, 2004; Tien MT . et al, 2006**). D'autres espèces du microbiote intestinal humain, tels *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve*, et *Fecalibacterium prausnitzii* ont la capacité de diminuer la réponse pro-inflammatoire des entérocytes en produisant des métabolites qui ciblent la voie NF- κ B (**Sokol H. et al, 2008; van Baarlen P., et al, 2009**).

Part ailleurs, Le tissu lymphoïde associé au tube digestif appelé GALT pour (Gut-associated lymphoid tissue), organisé sous la forme de plaques de Peyer et follicules lymphoïdes isolés. Participant d'une autre façon à la régulation du système immunitaire on associe à des cellules de l'épithélium spécialisées, les cellules M. qui permettent par leur capacité endocytaire de transporter et transposer continuellement les antigènes microbiens de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde muqueux sous-jacent où des cellules dendritiques présentent l'antigène à des cellules naïves B et aux lymphocytes T CD4 (**Murphy KM et Travers P., 2008**). Dans le cas où les signaux de tolérance sont induits par les microorganismes symbiotiques, les cellules dendritiques sont maintenues dans un état quiescent. Quand ces cellules présentent l'antigène à des lymphocytes T CD4 naïfs, elles entraînent leur différenciation en sous-populations régulatrices (**Murphy KM et Travers P.,**

2008): les lymphocytes T CD4 Treg et les lymphocytes pro-inflammatoires, T CD4 helper (TH1, TH2 et TH17). Les lymphocytes Treg induisent un état de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales par inhibition de la réponse inflammatoire, et cela grâce à la biosynthèse de cytokines anti-inflammatoires telles l'interleukine IL-10 et le TGF- β (**Murphy KM et Travers P., 2008**).

En revanche, dans le cas d'une réponse pro-inflammatoire induite par la reconnaissance d'antigène de pathogènes par l'entérocyte, les cellules dendritiques provoquent la différenciation exclusive des cellules effectrices TH1 et TH17 qui induisent une forte réponse inflammatoire contre les micro-organismes invasifs (**Maynard CL. et Weaver CT., 2009**).

Tableau N°03 : Interaction entre le microbiote et le système immunitaire (Maynard CL. et Weaver CT., 2009)

Micro-organismes commensaux	Micro-organismes pathogènes
<p>Les antigènes bactériens du compartiment luminal activent les NLRs cytoplasmiques. La réponse aux MAMPs commensaux induit un signal de tolérance immunitaire via le <i>transforming growth factor β</i> (TGF-β), la <i>thymic stromal lymphopoietin</i> (TSLP) et les prostaglandines E2. Ces médiateurs anti-inflammatoires concourent à établir une réponse immunitaire physiologique de bas grade dirigée contre le microbiote intestinal. Parallèlement, en réponse à ces antigènes commensaux, l'épithélium intestinal exprime de multiples effecteurs anti-microbiens comme les peptides antimicrobiens (α-defensines), des espèces réactives oxygénées (ROS pour reactive oxygen species) et le mucus intestinal (Macdonald TT. et Monteleone G., 2005). L'action concertée de ces composants protecteurs aide au maintien d'un « no man's land » stérile immédiatement adjacent à l'épithélium de surface.</p>	<p>les microorganismes pathogènes établissent un contact direct avec les entérocytes et pénètrent fréquemment l'épithélium intestinal. Cela provoque une réaction intense des NLRs et des TLR qui engendre la biosynthèse d'effecteurs antimicrobiens, de cytokines et chimiokines inflammatoires dont le tumor necrosis factor alpha (TNF-α), l'interferon-γ (IFN-γ), l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-23, qui provoquent une réaction inflammatoire majeure.</p>

4. La dysbiose intestinale :

Aujourd'hui, de plus en plus d'arguments démontrent le rôle clef du microbiote intestinal dans la pathogénicité. Plusieurs études montrent que la dysbiose, définie comme une altération dans la richesse et les fonctions du microbiote, est probablement un événement déterminant dans le développement des pathologies. Mais il reste difficile de conclure un rôle inducteur et/ou amplificateur (**Manichanh C. et al, 2006; Swidsinski A. et al, 2002**).

Or, D'un point de vue quantitatif, plusieurs pathologies montrent une concentration bactérienne bien plus élevée au niveau des lésions des muqueuses suggérant un défaut dans les mécanismes qui normalement séquestrent les bactéries pathogène (**Walker A.W. et al, 2011**)

. D'un point de vue qualitatif, la diminution de la biodiversité du microbiote intestinal bénéfique en faveur des germes pathogènes influence l'apparition de certaine pathologie et notamment les cancers (**Walker A.W. et al, 2011**).

4.1. Microbiote et le cancer colorectal :

Les découvertes récentes en microbiologie médicale de carcinogénèse d'origine infectieuse tel le cas de certains virus (virus de l'hépatite B HBV, Epstein barr virus HPV, Human papilloma virus HPV). A fait naître l'hypothèse que le cancer pouvait avoir lui aussi une origine infectieuse bactéries (**Kuper H. et al, 2000**).

A l'heure actuelle, il existe peu d'étude sur le sujet mais le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la carcinogénèse colique semble être de plus en plus évident (**Davis CD. et Milner JA., 2009; Sobhani I. et al, 2011**).

Le rôle des bactéries est plus controversé, étant donné la difficulté de savoir si les bactéries retrouvées dans certains cancers sont la cause ou une conséquence de la carcinogénèse. Cependant, certains agents bactériens (*Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis* toxigène) semblent impliqués dans les cancers chez l'homme et chez l'animal, le plus souvent par le biais d'une infection chronique (**Wu S. et al, 2000; Franco AT. et al, 2005**). Le microbiote intestinal influence les facteurs de cancérogénèse :

4.2.L'alimentation et le cancer :

Le colon humain est constamment exposé à un complexe de composés, qui sont d'origine alimentaire ou le résultat de processus de digestion ou d'excrétion microbiens. Certains de ces composés peuvent endommager la muqueuse intestinale et provoquer un cancer. L'interaction entre l'alimentation et le microbiote représente un facteur de risque du CCR (**Scanlan PD *et al*, 2008 ; Huycke MM. et Gaskins HR., 2004, O'Keefe SJ. *et al*, 2007**), à travers le métabolisme de certain groupe bactérien qui produisent des mutagènes et des métabolites réactif cancérigènes. De façon à promouvoir des lésions de l'ADN dans les cellules épithéliales (**Huycke MM. et Gaskins HR., 2004, Hope ME. *et al*, 2005**).

Certain microorganisme du microbiote intestinal lié à un certain régime alimentaire augmente le risque de développé un CCR (**Mai V. *et al*, 2009; O'Keefe SJ. *et al*, 2009**). Le cas de la pyrolyse de la créatinine sucré qui est pro-carcinogène et qui est ensuite converti par l'espèce *Eubacterium* pour donne un mutagène direct (**Carman RJ. *et al*, 1988**). L'alcool déshydrogénase microbienne (ADH) exprimée par un certain genre bactériens est impliqué dans l'induction de dommage à l'ADN dans les cellules épithéliale, en outre la présence de l'ADH et l'éthanol microbiens conduisent à la production d'un composé chimique carcinogène connu l'acétaldéhyde (**Obe G. et Anderson D., 1987**). D'autre part, les *Bactéroide* produisent au niveau du colon les fecapentènes, des composés qui sont des lipides polyinsaturés possédant un effet mutagénique, en présence de glutathion il endommage l'ADN à des concentrations micromolaires (**Povey AC. *et al*, 1991**).

D'autre part, le régime alimentaire avec un certain genre bactérien jouerait en faveur du développement du CCR, il a été prouvé que la consommation d'aliment à haute teneur en graisse induit une sécrétion forte d'acide biliaire qui corrélée avec le risque de CCR (**Costarelli V., 2009**). Effectivement, les sels biliaire rencontrent les bactéries anaérobies facultatives et deviennent le substrat d'une biotransformation (**Ridlon JM. *et al*, 2006**). La dehydroxylation des acides biliaire décanjugués conduit à la formation d'acide biliaire secondaire dont le rôle est co-carcinogènes ou promoteurs de tumeur dans le CCR est clairement établi (**Costarelli V., 2009**). En particulier, l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique sont liés à la carcinogénèse du colon dans plusieurs étude épidémiologique (**Bernstein H. *et al*, 2005**).

4.3. Les intermédiaires réactifs de l'oxygène :

Le colon est témoin de modification chimique et la production par la flore microbienne des intermédiaires réactifs de l'oxygène tels que superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, les radicaux d'hydroxyle et le peroxydinitrite attaquent directement ou indirectement l'ADN. Effectivement l'espèce *Eubacterium Faecalis* produit du superoxyde cellulaire provoquant ainsi des lésions de l'ADN des cellules épithéliales. Les bactéries sulfidogéniques qui utilisent le sulfate comme oxydant la dégradation de la matière organique forme le sulfure d'hydrogène qui influe la formation du CCR (Levitt MD. et al, 1999). Par ailleurs, la taurine qui est un acide biliaire conjugué, est réduite et transformé en sulfure d'hydrogène après déconjugaison, induit la carcinogénèse en augmentant la prolifération cellulaire et inhibant le métabolisme du butyrate (Ridlon JM. et al, 2006).

4.4. L'inflammation et le cancer:

Outre la production du microbiote de substance carcinogène, cocarcinogène ou pro-carcinogène, certain microorganismes interviennent à différente phase du processus néoplasique par l'induction d'une inflammation des muqueuse. Effectivement Virchow en 1863 a été le premier a suggérée la relation entre le cancer et l'inflammation, ce qui a été prouvée par plusieurs étude par la suite. Les bactéries du microbiote agissent ainsi par deux voies (McConnell BB. et Yang VW., 2009; Hope ME. et al, 2005; Horst D. et al, 2009):

- **La voie directe :** liée aux propriétés des bactéries à produire des toxines
- **La voie indirecte :** par l'intermédiaire d'inflammation chronique non spécifique

La réponse inflammatoire aberrante dans le tractus digestif d'origine non infectieuse conduit à une dysbiose intestinale en faveur des pathobiontes ou des pathogènes allochtones (Horst D. et al, 2009). L'envahissement de ces microorganismes pathogènes contribue à un état pro-inflammatoire, auto-inflammatoire entretenue, en basculant la balance d'un état d'inflammation physiologique a un état d'inflammation majeur (Round JL. et Mazmanian SK., 2009) voir chronique auto-entretenu, ainsi la dysbiose peut favoriser le développement du CCR (Uronis JM. et al, 2009; Stecher B. et Hardt WD., 2008; Lupp C. et al, 2007), en agissent sur deux phase important dans le processus de transformation néoplasique induisant le cancer colorectal :

4.4.1. Rôle de l'inflammation dans la phase d'initiation du cancer :

La première phase d'initiation tumorale ou la cellule normale acquiert son 1^{er} événement mutationnel ce réalise en réponse à un environnement inflammatoire, les cellules inflammatoires activées (macrophage, neutrophiles) sont généralement à l'origine d'un stress oxydant soit directement par la production de composées ROS (ractive oxygen species) et RNI (reactive nitrogen intermediates) soit indirectement via la production des cytokines (TNF α) (**Grivennikov SI. et al, 2010**). Ce stress oxydant augmente le taux de mutations en induisant des lésions de l'ADN qui touchent principalement les gènes du système de réparation de l'ADN MMR en inhibant par oxydation ces enzyme (**Hussain SP. et al, 2009; Colotta F. et al, 2009**) permettant ainsi la prolifération des cellules mutées. D'autre part ces altérations qui peuvent conduire à l'apparition du phénotype MSI, impliqué dans le CCR.

4.4.2. Rôle de l'inflammation dans la phase de promotion du cancer :

Le processus inflammatoire a la capacité d'exercé un effet inducteur a différent niveau de cancérogénèse. Les cytokines inflammatoires dont les TNF α et l'interleukine-1 produites par les cellules inflammatoires activent les facteurs de transcription, NF- κ B et STAT3. Qui sont des acteurs clé de l'inflammation chronique et le développement du cancer (**Kraus S. et Arber N., 2009**). Une fois activée elle stimule l'expression des gènes pro-inflammatoire à l'origine d'un stress oxydatif qui régule l'expression des gènes anti-apoptotique, la prolifération cellulaire. De plus la croissance tumorale nécessite des apports nutritifs croissants à l'origine d'une hypoxie tumorale et d'un recrutement de macrophage TAM (Tumor Assosiated Macrophages), activent la transcription de facteur pro-angiogénique (HIF, VEGF) régulés par ces dernier (**Kujawski M. et al, 2008; Turnbaugh PJ. et al, 2009**). Cette néo-angiogenèse est une étape capitale dans le développement et la croissance tumorale (**Horst D. et al, 2009; Femia AP. et al, 2010; Grivennikov SI. et Karin M., 2010**).

D'autre part, NF- κ B est activé par différentes voie de signalisation passant aussi par les TLRs détecteur de microorganismes ou certaine protéine bactérienne ou virale et divers signaux de stress (**Yu H. et al, 2009**).

4.5. La virulence bactérienne et le cancer:

Le rôle carcinogène de certains Virus est aujourd'hui clairement démontré, alors celui des bactéries reste encore controversé par leur présence dans certains cancers étant la cause ou la conséquence. Néanmoins, de nombreuses études épidémiologiques ont étudié la possible association entre les bactéries et le CCR, ainsi une forte incidence les implique autant que facteur. Il est démontré que plusieurs agents bactériens pourraient intervenir dans le cancer colorectal (**Collins D. et al, 2011**) parmi eux (*Streptococcus Bovis*, *helicobacter pylori*, *Bactéroides fragilis* et *Escherichia coli*). Certains d'entre eux accentuent l'inflammation voire la rendent chronique alors que d'autres agissent avec des toxines qui perturbent le cycle cellulaire ou provoquent directement des lésions de l'ADN (**Collins D. et al, 2011**).

Chapitre IV :

Les Plantes Médicinales

Depuis les nuits des temps, les hommes apprécient les vertus que leurs procure les plantes médicinales et sont ont perpétuelle recherche de leurs molécules. Aujourd'hui encore les deux tires de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. Les connaissances de l'utilisation des plantes médicinales ce sont développer sous la forme de la phytothérapie.

1. La phytothérapie:

Le terme phytothérapie composée du nom grec de *Phyto* et *Therapia*, qui est l'art de soigner par les plantes médicinales qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques (**Sofowora, 2010**).

1.1.L'ethnopharmacologie:

Ce définit par l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques (**Dos Santos et Fleurentin, 1990**).

Ces démarches ont des approches transdisciplinaires, s'intéresse aux connaissances des populations concernant la recherche, la préparation et l'utilisation de remèdes médicinaux traditionnels. On relation étroite avec l'intervention de l'ethnobotanique car elle partage avec cette discipline l'étude des interrelations des hommes on particulier avec les plantes.

De ce fait, L'ethnopharmacologie à permit a travers les temps la découverte de nouvelles substances actives pour l'industrie pharmaceutique. Ainsi des principes actifs très employés à l'heure actuelle dans notre médecine moderne sont issus des savoirs médicinaux populaires et traditionnels : des antalgiques (morphine, aspirine), des antipaludéens (quinine, artémisinine), des psychotropes (réserpine, mescaline) ou encore des toniques et stimulants cardiaques (digitaline, quinidine).(**Gurib-Fakim, 2006**).

D'autre part, les traitements anticancéreux issu des plante médicinale en vue une nouvelle ère de recherche depuis la découverte de la Vinblastine et Vincristine qui sont des médicaments chimiothérapique avec un effet ralentissent et atténuant la croissance cellulaire agissant au niveau du cycle cellulaire (**Shoeb, 2006**). De même, la pactitaxel issu de plante est un anticancéreux efficace dans le traitement du cancer de l'ovaire, le sein, et les poumons (**Kaur et al., 2011**).

1.2. Les plantes anticancéreuses :

Les plantes anticancéreuses sont des plantes dont les phytoconstituants ont la capacité d'effectuer une activité anticancéreuse (**Lantia et al., 2008**).

De nos jours un nombre important de médicaments anticancéreux commercialisés sont obtenus soit directement de la nature ou par modification structurale d'un composé naturel, soit par synthèse d'un nouveau produit prenant modèle d'un composé naturel (**Gordaliza, 2007**).

En 2011, **Sakarkar et Deshmoukh** dans leur revue de littérature ont rapporté 32 plantes dont l'activité anticancéreuse a été démontrée et documentée. Alors que bien avant **Hartwell** en 1969, a décrit 3000 espèces végétales utilisées dans la thérapie du cancer. La liste de **Sakarkar et Deshmoukh, (2011)** est rapportée dans le tableau suivant :

Tableau N° 04: Plante à activité anticancéreuse (Sakarkar et Deshmoukh, 2011)

Nom botanique	Famille	Nom commun
<i>Allium sativum</i>	<i>Liliaceae</i>	Garlic
<i>Actinidia chinensis</i>	<i>Actinidiaceae</i>	China gooseberry Kiwifruit
<i>Aloe ferox</i> <i>Aloe barbadensis</i>	<i>Liliaceae</i>	Aloe vera
<i>Ananas comosus</i>	<i>Bromeliaceae</i>	Pine apple, ananas
<i>Angelica sinensis</i>	<i>Umbelliferae</i>	Angelica
<i>Annona species</i>	<i>Annonaceae</i>	Monkey species
<i>Arctium lappa</i>	<i>Compositae</i>	Burdock
<i>Astragalus membranaceus</i>	<i>Papilionaceae</i>	--
<i>Betula utilis</i>	<i>Betulaceae</i>	Bhojpatra
<i>Camellia sinensis</i>	<i>Thaceae</i>	Tea plant
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Apocyanaceae</i>	Vinca
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Oocystaceae</i>	--
<i>Colchicum luteum</i>	<i>Liliaceae</i>	Colchicum
<i>Combretum caffrum</i>	<i>Combretaceae</i>	--
<i>Curcuma longa linn</i>	<i>Zinziberaceae</i>	Turmeric
<i>Echinacea angustifolia</i>	<i>Asteraceae</i>	Black samson
<i>Fagopyrum esculentum</i>	<i>Polygonaceae</i>	Vitamin p
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Ginkgoaceae</i>	Kew tree

Chapitre IV : Plante Médicinale

<i>Glycin max</i>	<i>Luguminosae</i>	Soyabean
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Leguminosae</i>	Liquorice
<i>Gossypium barbadense</i>	<i>Malvaceae</i>	Raw cotton
<i>Gyrophora esculenta</i>	<i>Umbelicariaceae</i>	Mushroom
<i>Lentinus edodes</i>	<i>Agaricaceae</i>	--
<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Linaceae</i>	Flax seed, linseed
<i>Mentha species</i>	<i>Labiataeae</i>	Pudina
<i>Ochrosia elliptica</i>	<i>Apocynaceae</i>	--
<i>Panax ginseng</i>	<i>Aralaceae</i>	Ginseng
<i>Picrorrhizia kurroa</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	Picrorrhizia (kutki)
<i>Podophyllum hexandrum</i>	<i>Berberidaceae</i>	Podophyllum
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxaceae</i>	Pacific yew
<i>Withania somnifera</i>	<i>Solanaceae</i>	Ashwagandha
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Ginger

Tableau N°05 : liste de quelques composés naturels utilisés comme anticancéreux (**Galkin, 2008**)

Composé	Source naturelle	famille	Introduite en
Bleomycin	<i>Streptomyces verticillus</i>	<i>Actinomycetales</i>	1962
Vincristine	<i>Cantharanthus roseus (L.) G. Don</i>	<i>Apocynaceae</i>	1963
Vinblastine	<i>Cantharanthus roseus (L.) G. Don</i>	<i>Apocynaceae</i>	1965
Dexorubicin	<i>Streptomyces peucetius</i>	<i>Actinomycetales</i>	1974
Mitomycin	<i>Streptomyces caespitosus</i>	<i>Actinomycetales</i>	1974
Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia nutt</i>	<i>Taxaceae</i>	1992

1.3.Mécanisme d'action :

Les dérivés issus des plantes agissent par des mécanismes différents d'une plante à une autre et d'un type de tumeurs à un autre pour la même plante (**Lantiea et al., 2008**).

Différents mécanismes sont possibles pour la prévention du cancer par les plantes selon **Huang, (2009)** :

- **Activité antioxydante** : plusieurs mécanismes sont utilisés comme scavenging des radicaux libres, promotion de l'activité SOD et la diminution de la lipoperoxydation
- **Propriétés antiangiogéniques et antimutagéniques** : par l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'expression de l'oncogène, l'induction de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs Inhibition du (vascular endothelial growth factor) et la prevention de (DNA binding)
- **Amélioration des fonctions immunitaire** : par la suppression de la production de TNF, une cytokine pro-inflammatoire et les facteurs de croissance pour la plupart des cellules tumorales et la suppression de LOXs, iNOS, chemokines et d'autres molécules.
- **Inhibition d'enzymes** : l'enzyme de la phase I (bloque l'activation des carcinogènes) ; COX-2 ; i NOX ; XO ; l'enzymes de la transduction des signaux comme PKC et PTK : Topoisomérase I et II ; telomerase ; urease ; lipase ; angiotensin I-converting, l'enzyme de l'ADN methyltransferases qui cause la réactivation d'un gène suppresseur de tumeurs important la p16).
- **Induction d'enzymes et promotion de la détoxification** : par l'enzyme de la phase II, comme UDP-glucuronosyl transférase ; et quinine réductase ; glutathione peroxydase ; catalase ; SOD ; cytochrome p450 epoxide hydrolase ; NADPH : quinone réductase
- **Inhibition de l'adhésion et de l'invasion cellulaire** : par l'inhibition de l'expression des molécules de l'adhésion cellulaire : ICAM-1 et VCAM-1; l'inhibition de l'invasion cellulaire, l'induction de la différenciation cellulaire.
- **L'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose** : par l'inhibition du cycle cellulaire en différentes phases : G1, S, S/G2, et G2 ; l'effet direct ou indirect sur l'arrêt du cycle ; induction de l'apoptose en impliquant p53, la BCL-2 et les caspases.
- **Inhibition des voies de transduction du signal** : Les voies de signalisation Nrf-KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) ; La voie NF-κB et AP-1, incluant la

suppression de l'activité de c-Jun ; La voie Wnt ou β -catenin (inhibition directe de la mitose). La voie MAPK ; Les voies (growth-factor receptor mediated).

- **Inhibition de l'acrylamide, de la nitrosation et de la nitration** : par l'inhibition de la formation de l'acrylamide et des amines hétérocyclique.

1.4.Rôle des polyphénols dans la prévention et le traitement du cancer :

L'activité anticancéreuse des plantes est relativement due à leurs phytoconstituants dont les plus importants sont les polyphénols. Ces molécules spécifiques du règne végétal issu de leur métabolisme secondaire sont présentes chez tous les végétaux supérieurs.

Les polyphénols forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins. Ils sont divisés en plusieurs catégories: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols; anthocyanes, coumarines, lignanes, quinones, acides phénols, xanthones ainsi que d'autres classes qui existent en nombres considérables (**Dacosta, 2003**).

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (**Bruneton, 1999**). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Dacosta, 2003**).

Ces molécules traces jouent un rôle important en agissant comme des agents biologiquement actives (**King et Young, 1999**). De nos jours la recherches sur les composés phénoliques ce fait de plus en plus poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anti-thrombotique, cardioprotective, vasodilatatoire et anticarcinogénique que nous essayerons de développer le plus dans ce chapitre afin d'appuyer l'hypothèse de leur actions vis-à-vis des pathologies cancéreuses (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007**).

Des recherches menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré des propriétés biologiques intéressantes pour la prévention du cancer par les polyphénols. (**Stagos D. et al, 2012**). De nombreuses études ont montré que trois types de cancers (sein, prostate et digestif) peuvent être fortement influencés par l'alimentation notamment l'apport en antioxydants. En outre,

l'huile d'argan pourrait grâce à sa teneur en polyphénols, contribuer à la prévention de certains cancers tels que le cancer de la prostate (**Bennani H. et al, 2009**).

Par ailleurs, Des recherches plus récentes ont décrit les activités anti-cancérogènes de la curcumine, le resvératrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) pour le traitement du cancer du col (**Di Domenico F. et al, 2012**). Les effets inhibiteurs du thé vert et noir dans le traitement du cancer ont largement été étudiés. Les polyphénols du thé de type flavan-3-ol sont des composés bioactifs puissants qui interfèrent avec l'initiation, le développement et la progression du cancer par des processus critiques (**Lambert, J. D. et Elias, R. J., 2010; Yang, C. S. et al., 2013**). Ils ont la capacité d'interrompre ou inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur les molécules de réseau de signalisation intracellulaires impliquées dans l'initiation et / ou la promotion d'un cancer pour arrêter ou inverser la phase de progression du cancer. Les polyphénols peuvent également déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire (**Link A. et al., 2010**).

De ce fait, l'utilisation des plantes médicinales s'impose, parmi le réservoir naturel plusieurs plantes à utilisation courante sont aujourd'hui en faveur de la recherche scientifique pour trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques naturelles sans effet indésirable. Parmi cette longue liste l'*Atriplex halimus* dite (Gtaf) plante médicinale très utilisée attire notre attention et qui fut le centre de la problématique de notre recherche et fera l'objet des essais dans notre étude autant que traitement préventif et curatif contre le cancer colorectal chimio-induit par le DMH.

2. Étude botanique de l'*Atriplex halimus*:

2.1. Généralité :

Ce genre compte près 130 espèces, L'*A. halimus* est de la famille des chénopodiacées. Récemment remplacée par la famille des Amaranthacées. Cette dernière comprenant environ une centaine d'espèces des régions tempérées et chaudes. Les espèces d'*Atriplex* poussent dans les sols légers, médiocres, arides; elles demandent une situation ensoleillée. 19 espèce d'entre elles résistent remarquablement aux sels marins et aux embruns.

Il existe plusieurs espèces et variétés d'*Atriplex*. Par ailleurs, l'analyse botanique consacrée au genre *Atriplex* montre que *A. halimus* présente un polymorphisme plus important que celui des autres espèces du même genre. (**Talamali et Coll., 2001; Talamali et Coll., 2007**).

2.2. Noms vernaculaires :

L'*Atriplex halimus* est connu sous plusieurs nominations selon les pays. Il est connu sous le nom de: Pourpier de mer, l'Arroche maritime ou blanquette, Arroche salée, l'Arroche halime, épinard de mer. Dans les pays du Maghreb : «Aramass» (**Aboura, 2006**), «Guettaf » en Algérie (**Ozenda, 2004**) et «Chenane» en Maroc.

2.3. Répartition géographique de l'*A. halimus* :

Originaires de toutes les régions tempérées et subtropicales du monde. Beaucoup sont des halophytes littorales (région méditerranéenne), d'autres des halophytes continentales des déserts salés (**Talamali et Coll., 2001**).



Figure N°10 : Image représentatif de l' *Atriplex halimus* (Castroviejo S. et al., 2007)

2.4. Description morphologique :

l'*Atriplex h.* est un arbuste buissonneux d'un aspect blanc argenté de 1 à 2 mètres, caractérisée par des feuilles de 2-5 cm, peu épaisse, peu sinuées, ovales 2 fois plus longues que larges, ces fleurs sont Jaunâtres, en épis allongés formant une panicule terminale nue ou un peu feuillée à la base. Les tiges sont blanchâtres dressées et ligneuses. (Ozenda, 2004). Sa rusticité et son système racinaire développé lui permettent de se développer sur un sol pauvre en minéraux essentiels

2.5. Classification :

Selon la classification A.P.G «Angiosperm Phylogeny Group» l'*Atriplex halimus* est classé dans le taxon suivant (Guignard et Dupont, 2004):

Règne : *Plantae* (Plante verte)

Groupe : Embryophytes (Plante terrestres)

Sous règne : *Tracheobionta* (Plante vasculaires)

Embranchement : *Spermaphyta* (Plantes à graines)

Sous embranchement : *Magnoliophyta* (Plantes à ovaires)

Classe : *Magnoliopsida* (Dicotylédones)

Sous classe : *Caryophyllidae*

Ordre : *Caryophyllales*

Famille : *Amaranthaceae* (*Chenopodiaceae*)

Genre et espèce : *Atriplex halimus* L

2.6. Etude phytochimique :

L'étude de la composition chimique de l'*A. halimus* dépend de plusieurs paramètres tels que le climat, l'âge de la plante et la saison (**Abbade et Coll., 2004**). Les travaux qui ont été effectués sur l'analyse chimique des extraits de l'*Atriplex* montrent que cette plante est très riche en différents composants comme les fibres, sels minéraux (**Esplin et Coll., 1937**), les vitamines A, C, et D (**Belenkii et Sakharova, 1939; Harie, 1947**).

L'étude de **Emam S.S., (2010)** a permis de mettre en évidence quinze acides aminés différents ainsi que les métabolites secondaires comme les phénols totaux, les saponines glycosidiques, les alcaloïdes, les tannins, les résines, les betaines et les flavonoïdes dont les flavonols constituent la classe chimique majeure chez la plupart des espèces *Atriplex* (**Bylka et al., 2001; Bylka et al., 2004; Benhammou et al., 2009; Emam, 2011; Roux, 2005**).

2.7. Usages thérapeutiques d'*A. halimus* :

L'utilisation la plus répandue en médecine traditionnelle est largement connue pour ces propriétés hypoglycémiantes et hypolipémiantes (**Yaniv et al., 1987; Mirsky et Nitsa, 2001**). **Aharonson et Coll. (1969)** ont montré que l'extrait aqueux de l'*A. halimus* ainsi que le jus pressé des feuilles provoquent un effet hypoglycémiant alors que **Mertz et Coll. (1973)** ont prouvé que les cendres de l'*A. halimus* potentialisent l'effet de l'insuline (**Shani et Coll., 1972; Metz et Coll., 1973 ; McKell, 1994**).

Atriplex h. est aussi utilisée pour soigner les inflammations des voies urinaires (cystites) et les lithiases urinaires (**Belouad, 2001 ; Emam, 2011**).

Il est aussi utilisé comme draineur cutané et rénal, diurétique et dépuratif, il accompagne tout régime qui nécessite un drainage des tissus et la désincrustation des déchets et toxines (**Belouad, 2001**).

Au Sahara occidental, les cendres d'*A. halimus* potentialisent l'effet de l'insuline (**Shani et al., 1972 ; Mertz et al., 1973 ; McKell et al., 1994 ; Mirsky et Nitsa., 2001**), aussi elles sont utilisées dans le traitement de l'acidité gastrique.

Les graines, crues et broyées, sont ingérées comme vomitif (**Bellakhdar, 1997**). Les racines, découpées en lanières à la manière du siwak, servent pour les soins de la bouche et des dents.

Les feuilles sont utilisées pour le traitement des maladies cardiaques et le diabète (**Bellakhdar, 1997; Said et al., 2000**).

Grâce à ces propriétés antioxydantes, certains flavonoïdes ont un effet protecteur des tissus du foie contre le cancer (**Emam S.S., 2011**). La poudre des feuilles est aussi utilisée contre les douleurs des intestins, les douleurs des reins et les cancers internes.

Le broyat des feuilles, en décoction, est utilisé comme antidiabétique et contre l'intoxication. Alors que, leur infusion est utilisées comme anti diarrhéiques. Par contre, le décocté des feuilles est administré contre le diabète, les calculs rénaux et le froid (**Ghourri M. et al., 2012**). La poudre des feuilles ajoutée à tous les repas sert à traiter le cancer d'ovaire (**Ghourri M. et al., 2012**).

D'autre par les feuilles, en décoction dans le thé, sont recommandées contre le rhumatisme. Dans d'autre mode d'utilisation : La poudre des feuilles mélangée à l'huile d'olive ou mélangé au liquide des bougies ou en cataplasme est appliquée contre le rhumatisme.

La poudre des feuilles ajoutée au lait fermenté est aussi utilisée d'une autre façon comme antidiabétique.

Les feuilles fraîches, en décoction, sont indiquées comme un traitement des kystes de vagin, le diabète et le cancer de la gorge (**Ghourri M. et al., 2012**).

Par ailleur, Les Sahariens attribuent aussi à cette plante la propriété de soigner trypanosome.

L'*Atriplex* est également recommandé pour traiter la malaria (**Emam S.S., 2011**). La pipérine et ses dérivés sont des drogues anticonvulsantes et anti-épileptiques efficaces (**Pei Y. Q., 1983**).

Etude Expérimentale

Matériels et Méthodes

Malgré les progrès avancés dans le traitement de nombreux cancers leur récurrence est encore trop fréquente. Aujourd'hui il est nécessaire de se tourner vers d'autre type de prise en charge de la maladie, à savoir la phytothérapie.

L'intérêt porté aux principes actifs issus des plantes médicinales augmente de plus en plus ces dernières années. L'objectif de cette étude porte sur évaluation de l'utilisation de l'extrait polyphénolique de l'*Atriplex halimus* dans le traitement du cancer colorectal.

Ce travail à été réalisé aux niveaux du Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS) et l'animalerie du département Biologie de la faculté Science de la Nature et de la Vie de l'université de Mascara. Sur une durée de 6 ans de 2016 jusqu'à 2022.

L'étude est constitué de plusieurs volé afin d'aboutir à notre objectif principal

- Etude ethnobotanique de la plante *Atriplex halimus*
- Evaluation phytochimique des extraits de la plante.
- Détermination de la toxicité des extraits de la plante.
- Vérification scientifiquement de l'application phytothérapeutique de l'*Atriplex h.* comme agents anticancéreux dans le cancer colorectal chimio-induit par le 1,2-diméthylhydrazine (DMH) chez les rats Wistar.

I. Matériels :

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal sélectionné pour la présente étude est constitué des parties aériennes fleuries de l'*Atriplex h.* Colletées en Mars 2016 dans la région de Mascara située nord-ouest d'Algérie. L'identification botanique était réalisée au niveau du département d'Agronomie de l'Université de Mascara par Dr. Righi Kada. Ainsi que par le service de protection des végétaux et des forêts de la Wilaya de Mascara.



Figure N° 11: l'*Atriplex halimus*

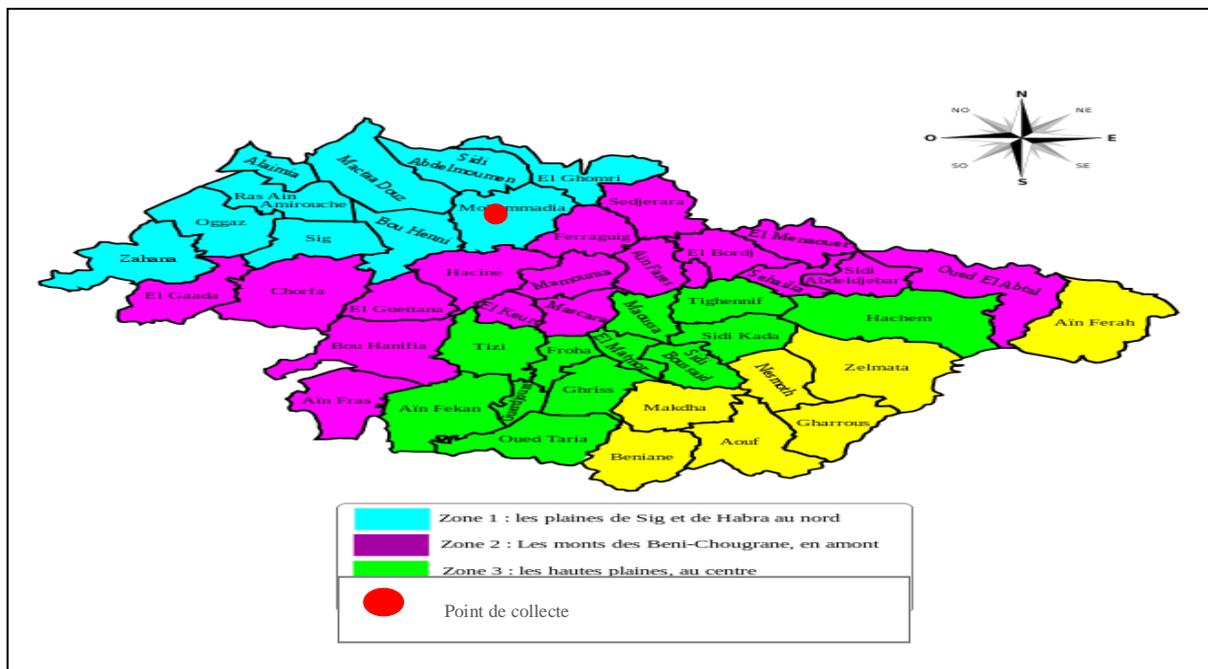


Figure N° 12: Situation géographique de la station de collecte

2. Les animaux :

Notre étude a été réalisée sur des rats Wistar albinos adulte mâle et femelle de poids compris entre 165g et 200g pour (l'étude de la toxicité) et des rats mâles de poids entre 185-200 g pour (l'étude de l'activité anticancéreuse). Les animaux provenaient de l'Animalerie du département Biologie de la faculté Science de la Nature et de la Vie de l'université de Mascara. Les animaux ont été maintenus dans des conditions d'élevage favorables selon les conseils généraux pour l'utilisation des animaux de laboratoire (Council of European Communities, 1989) dans des cages adaptés avec une température constante (22 ± 2)°C et soumis à un cycle de lumière et obscurité 12/12h et une humidité de $50 \pm 10\%$. Les animaux recevaient de la nourriture (ONAB, O/Tlilet, Oran, Algérie) et une eau potable était mise à leur disposition *ad libitum*.

II. Méthodes :

1. ETUDE ETHNOBOTANIQUE

L'enquête ethnobotanique était réalisée dans la Wilaya de Mascara. Elle consistait à questionner les praticiens traditionnels pour s'enquérir de leur savoir médicinale sur la plante l'*Atriplex halimus*, dans le but de déterminer les pathologies dans les quelles cette plante est utilisée ainsi que la méthode et la dose approprié.

1. Collecte des données :

Afin de connaître l'éventuel usage de notre espèce végétale dans la pharmacopée traditionnelle de notre région, Un total de 200 personnes interviewées auprès des populations (tradipraticiens, herboristes, guérisseurs) par l'intermédiaire d'un questionnaire (voir annexe 05).

2. Analyse des données :

Les données inscrites sur des fiches brutes ont été saisies et traitées par logiciel tableur Excel Version 2007. Les données ont fait l'objectif d'analyse qualitative et quantitative en faisant appel aux méthodes simples des statistiques descriptives utilisant les pourcentages à fin d'établir ce qui ensuit (**Ait Ouakrouch I., 2015**):

1. Les catégories de pathologie dans lesquelles l'*Atriplex halimus* est utilisée;
2. Les parties floristiques utilisées dans les traitements;
3. Le mode d'utilisation de la plante;
4. La dose à utilisée.

2. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

1. Préparation du matériel végétal :

D'après l'étude ethnobotanique, Trois types de préparation aqueuse à base d'*Atriplex h.* sont les plus utilisées (décocté, infusé et macérât), de ce fait nous concentrerons notre étude sur ces dernier.

Les feuilles de la plante étaient laissées sécher pendant sept jours, puis le séchât réduit en poudre. Dix grammes de poudre de la plante ont été utilisés pour la réalisation des différents extraits, ajouté à 100 ml d'eau distillé. Le mélange a été filtré, puis le filtrat concentré, lyophilisé et stocké à +4°C jusqu'à son utilisation (**Fellah et al., 2012**) .

Décocté (10%) : le matériel végétal (en poudre) sont mise à ébullition pendant 20 mn l'extrait est ensuite refroidi à la température ambiante, puis filtré. Le filtrat est collecté, concentré, lyophilisé et conservé à +4°C jusqu'à son utilisation.

Infusé (10%) : le matériel végétal (en poudre) sont mise à infuser dans l'eau bouillie pendant 20 mn. l'extrait est ensuite refroidi à la température ambiante, puis filtré. Le filtrat est collecté, concentré, lyophilisé et conservé à +4°C jusqu'à son utilisation.

Macérât (10%) : le matériel végétal (en poudre) sont mise à macérer à froid dans l'eau distillée durant la nuit. l'extrait est ensuite refroidi à la température ambiante, puis filtré. Le filtrat est collecté, concentré, lyophilisé et conservé à +4°C jusqu'à son utilisation.

2. Rendement de l'extraction :

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par (**Fellah et al., 2012**) :

$$R (\%) = \frac{M_{ext}}{M_{éch}} \quad M_{ext} \text{ est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg et}$$

$M_{éch}$ est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg

3. Screening phytochimique :

L'extrait de la plante a été soumis à un ensemble de réactions en tubes afin de détecter de façon qualitative les métabolites secondaires (Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, stéroïdes et terpènes) par des méthodes colorimétriques basés sur des réactions de précipitation et la formation de complexes insolubles et colorés (**Njoku V. et al., 2009 et Alorkpa EJ. et al., 2016**)

4. Analyse de l'extrait d'infusion de l'*Atriplex halimus* par HPLC sur Système LC Prominence-i LC 2030C :

L'analyse qualitative des composés polyphénoliques de l'extrait aqueux ont été analysées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sur un Système LC Prominence-i LC 2030C à colonne Ascentis C18 de 15 cm x 4,6 mm, 5 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (Attou S. *et al.*, 2020).

Deux μ l sont injecté dans un système d'éluant à gradient de solvants hydro-organique de méthanol et l'acide acétique à savoir. La phase mobile comportait 0.075 % acide acétique / eau (solvant A) et 0.075 % acide acétique / méthanol (solvant B) dans un mode de gradient linéaire étudiés, afin de fournir une résolution complète de tous les composants dans un temps d'analyse cohérent : 0 min, 2% de B; 5 min, 2% B; 60 min, 50% de B; 70 min, 50% B, 71 min, 2% B. thermostaté à 30° avec un débit de 0.08 ml/ mn, La gamme de longueur d'onde du le chromatogrammes étaient à 280 nm. L'acquisition des données a été réalisée par le logiciel Shimadzu Lab Solution ver. 5.10.153 Et comparé par littérature afin d'identifier la nature des métabolites (Attou S. *et al.*, 2020).

5. Dosage des polyphénols :

5.1.Polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de folin-ciocalteu (FC) décrite par Boizot N. et Charpentier J-P., (2006): 100 μ l d'extrait mélangé avec 500 μ l du réactif de folin et 400 μ l de Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant dix minutes et l'absorbance est mesuré à 760 nm par spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimé en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

5.2.Flavonoïdes :

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par Dehpeur *et al.*, (2009): 500 μ l de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 1500 μ l de méthanol à 95%, 100 μ l de AlCl₃ à 10 % (m/v), 100 μ l d'acétate de sodium 1 M et 2,8 d'eau distillée. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 mn. Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par méthanol à 95% et l'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimés en mg

équivalent quercétine/g de matière végétale sèche en référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

5.3. Les tanins condensés :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par **Ba et al., (2010)**: Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal Hcl à 8% (v/v), le méthanol à 37% (v/v) et 4% de vanilline dans du méthanol (m/v). Le mélange a été maintenu à 30°C avant le dosage. 200 µl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à 1000 µl de réactif de vanilline ; le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité à 30°C pendant 20 mn. l'absorbance est mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol (37%) et de Hcl (8%) à volume égal. Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchol /g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage du catéchol.

5.4. Activité antioxydante :

Le test de piégeage du radical libre DPPH : le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH. 50 µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0.0125 à 5 mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l). Le contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH (**Sanchez-Moreno C. et al., 1998**). La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 mn d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) (**Sanchez-Moreno C. et al., 1998**).

$$I\% = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs test}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

3. ETUDE DE LA TOXICITE

En ce basant sur les données recueillies de l'enquête ethnobotanique et afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité relative à l'utilisation de la plante lors de l'étude de l'activité anticancéreuse, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité et de déterminer la dose de traitement journalière non toxique.

1. Toxicité orale aiguë :

L'étude a été réalisée suivant la directive de l'ODCE N° 423 (2002). Chez les rats Wistar albinos adulte mâle et femelle de poids compris entre 165g et 200g Les animaux ont été répartis au hasard dans cinq groupes de (6 femelles et 6 male) dont un groupe témoin (eau distillée) et 4 groupes d'essai. L'extrait de l'*Atriplex h.* était repris dans l'eau distillé, puis administré aux rats en solution avec les doses suivante (2000, 1200, 600, 300 mg/kg de poids corporel) par gavage en utilisant une sonde intra-gastrique. Les signes de toxicité ont été recherché par observation visuelle chaque 2 heures jusqu'à 24 heures, puis chaque jour pendant 14 jours (Assam Assam et al., 2010). En plus de la mortalité, les quatre paramétré suivant ont été recherché : Apparence physique externe, changement du comportement et la variation du poids de l'animal. Le poids individuel de chaque animal a été déterminé avant l'administration de l'extrait, puis tous les 2 jours après administration de l'extrait pendant 14 jours.

2. Toxicité orale subchronique :

L'étude a été réalisée conformément à la ligne directrice N°407 de l'OCDE (2008). Pour cela 36 rats des deux sexes de poids compris entre 165g et 200g en fait l'objet de cette examen (6 males et 6 femelles) par lots avec un groupe témoin eau distillé, ont reçu quotidiennement par gavage pendant 28 jours les doses suivantes : 100, 200 mg/kg de poids corporel.

3. Suivi de la toxicité :

A la fin de l'expérimentation tous les animaux d'essai (à jeun la veille) pesés ont été euthanasiés et soumis à une dissection abdominale.

Les organes (reins, rate, foie, poumon, cœur) sont observés macroscopiquement *in situ*, prélevés et pesés. Le poids relatif de chaque organe a été ensuite calculé par rapport au poids corporel (Abimoslah et al., 2013 ; Vemu et al., 2015 ; 2016):

ROW= poids de l'organe / poids corporel du rat.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à partir de l'aorte abdominale, puis le sang a été recueilli sur:

- Des tubes EDTA pour la détermination des paramètres hématologiques: Red Blood Cells ou Globules rouges (RBC), Hématocrite (HCT), Plaquette (PLT), White Blood Cells ou Globules blancs (WBC), et Hémoglobine (HGB).
- Des tubes héparines centrifuges à 1500 tours/min pendant 5 min à 4°C pour la détermination des paramètres biochimiques suivant : Urée, Créatinine, les Transaminases (TGO, TGP), la PAL (phosphatase alcaline), TG et cholestérol totale.

4. EVALUATION *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE L'ACTIVITE DE L'*Atriplex halimus* SUR LE CANCER COLORECTAL CHIMIO-INDUIT

L'expérimentation de l'activité anticancéreuse de l'*Atriplex halimus* a été réalisée sur le modèle rat Wistar mâle de poids compris entre 185-200g chimio-induit par 1,2-diméthylhydrazine (DMH).

1. Principe :

1,2-diméthylhydrazine (DMH) est une substance cancérigène largement utilisés pour l'induction de la carcinogenèse colorectale chez les rongeurs. C'est un cancérigène indirect qui nécessite une activation métabolique. Le DMH est activée par les monooxygénases hépatiques de fonctionnalisation, en méthylazoxyméthanol (MAM). Le MAM est alors conjugué à l'acide glucuronique par des enzymes de conjugaison. Ce complexe hydrophile est excrété vers le côlon via la voie des acides biliaires. Il peut alors être déconjugué grâce à la β -glucuronidase bactérienne, libérant ainsi le MAM qui se transforme au métabolite cancérigène ultime hautement réactif Méthyldiazonium qui est ensuite réabsorbé par les colonocytes (Fiala E.S. et Stathopoulos C., 1984). Ce dernier agit sur le génome des cellules coliques et provoque ainsi le processus de cancérisation par la méthylation des bases de l'ADN des cellules épithéliales du compartiment prolifératif des cryptes, ce qui entraîne une perte importante de cellules coliques par apoptose, une augmentation de la prolifération, et une augmentation apparente des mutations des cellules épithéliales coliques (Chang W W L., 1984).

2. Protocole d'induction du cancer colorectal :

Dans ce modèle de cancérologie colorectal préclinique le DMH administré aux rats était dissous dans le NaCl 0.9% contenant 1,5% d'EDTA en véhicule ajustée à pH=6.5 à 1N de NaOH. Les animaux ont reçu une dose de (70 mg / kg / semaine) pendant cinq semaine en application sous cutanée selon la méthode décrite par Abdulaziz SS. *et al.*, (2020) avec des modifications (Voir annexe 04).

3. Etapes de tumorigénèse chimio-induite :

Le développement d'un cancer ou cancérogénèse chez l'homme, survient suite à une accumulation de mutations somatique d'une cellule entraînant des changements phénotypiques graduels jusqu'au néoplasie (Surh, 2003), ce processus se fait en plusieurs étape qui sont l'initiation (quelque jours), la promotion (des années), et la progression (1 à 5 ans), lors de l'initiation, la cellule est soumise a un agent dit carcinogène qui cible l'ADN et entraine des dommages génotoxiques. La cellule va proliférer anormalement suite à des changements épigénétique pour former des foyers préneoplasmiques (étape de promotion). Les lésions créés vont être plus proliférative et conduire à des tumeurs invasives et métastasique (étape de progression) (Surh, 2003).

Dans le cas du modèle de cancérogénèse par le DMH. Le carcinogènes est très spécifiques et induit des tumeurs colorectales de manière dose-dépendante (Shirai T., 1983), dépend du sexe (Breskvar L *et al.*, 1997) et de l'âge de l'animal (McMahon T. F *et al.*, 1990).

Les recherches ont démontré que le DMH produit des foyers de crypte aberrante (ACF), 8 à 12 semaines après sont application et ainsi des tumeurs coliques 30 semaines plus tard. Les traitements peuvent commencer avant l'exposition à l'agent cancérigène, pendant la phase d'initiation, pendant la phase de promotion ou de progression, ou pendant les deux phases (Femia A M. et Caderni G., 2008).

Induction par DMH

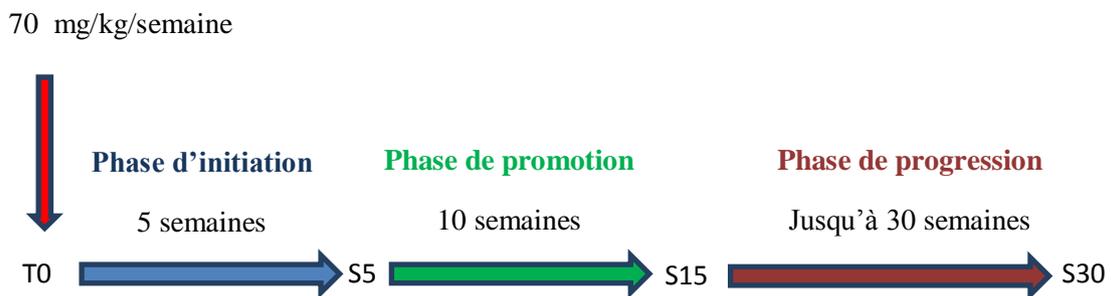


Figure N°13 : Schéma des étapes de carcinogénèse chimio-induite par le DMH.

4. Evaluation du traitement par l’*Atriplex halimus* dans cancer colorectal induit :

L’élaboration des traitements pour l’évaluation de l’effet de l’*Atriplex halimus* sur le cancer colorectal chimio-induit par le DMH dans notre étude a compris les essais de deux types de traitement (Voir figure 14): Traitement préventif (avant l’installation du cancer) et un traitement curatif après 30 semaines de l’induction (présence de tumeur).

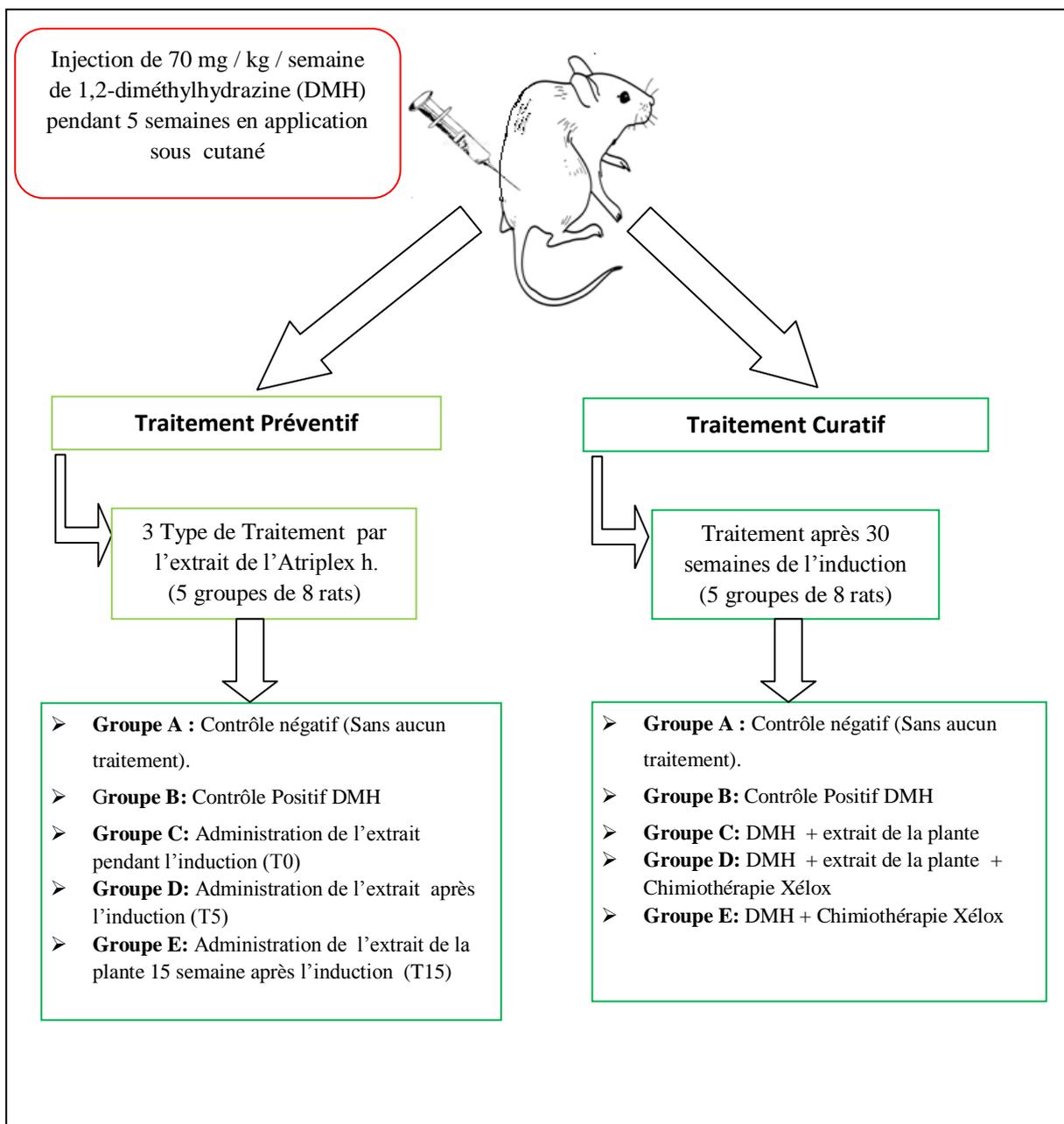


Figure N° 14: Protocole de l’étude de l’activité anticancéreuse de l’*Atriplex halimus*

4.1. Traitement préventif :

Une molécule est dite chimio-préventive si elle est capable d'interférer avec les étapes précoces de la cancérogénèse, en prévenant l'apparition et le développement de foyer paranéoplasiques chez des sujets à risque (**Russo, 2007**)

Dans cette recherche afin d'appréhender l'éventuel effet préventif de l'extrait de l'*Atriplex h.* le traitement était réalisé dans les premières étapes de l'initiation de la tumorigénèse par le DMH (Voir figure 15) :

4.1.1. Choix du traitement par l'*Atriplex halimus*:

D'après l'étude ethnobotanique effectuée sur le terrain le traitement chez l'homme par l'*Atriplex halimus* préconise l'ingestion de l'infusé aqueux d'environ 10g de poudre de la plante 3 fois par jour pendant 30 jours. En considérant que le poids biologique moyen d'un être humain est de 70 ± 10 kg, et la quantité d'extrait aqueux que l'on peut théoriquement obtenir par infusion à partir de ces 10g de poudre est d'environ 2,5 g rendement (25 %).

Le traitement chez l'homme consiste en l'ingestion quotidienne de 90 mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux pendant 30 jours. Suite à l'étude de la toxicité et la valeur la plus proche de celle déterminé par l'étude ethnobotanique. Une dose de 100 mg/kg a été finalement choisie pour l'estimation de la dose thérapeutique chez le rat.

Dans cet essai 40 rats Wistar mâle ont été utilisés. Les animaux ont été randomisés en 5 groupes de 08 rats. Recevant une dose de traitement par l'*Atriplex halimus* de 100 mg/kg/j à différentes étapes de cancérogénèse chimio-induite : à T0 lors de l'induction (au même temps que le DMH), à T5: à la fin de l'induction (après la dernière dose du DMH) et à T15: 15ème semaine après la dernière dose du DMH (début de la phase de promotion) (voir Tableau 06) Un groupe contrôle négatif sans induction (aucun traitement), et un groupe témoin positif (DMH) ont été inclus dans l'étude.

Tableau N°06 : Les différents groupes du traitement préventif

Groupe	Traitement
Groupe A (n°=08)	Témoin control négatif (Aucun traitement)
Groupe B (n°=08)	Témoin control positif (DMH)
Groupe C (n°=08)	Traitement préventif (DMH + l'extrait de la plante) à T0
Groupe D (n°=08)	Traitement préventif (DMH + l'extrait de la plante) à T5
Groupe E (n°=08)	Traitement préventif (DMH + l'extrait de la plante) à T15

T : le temps en semaine

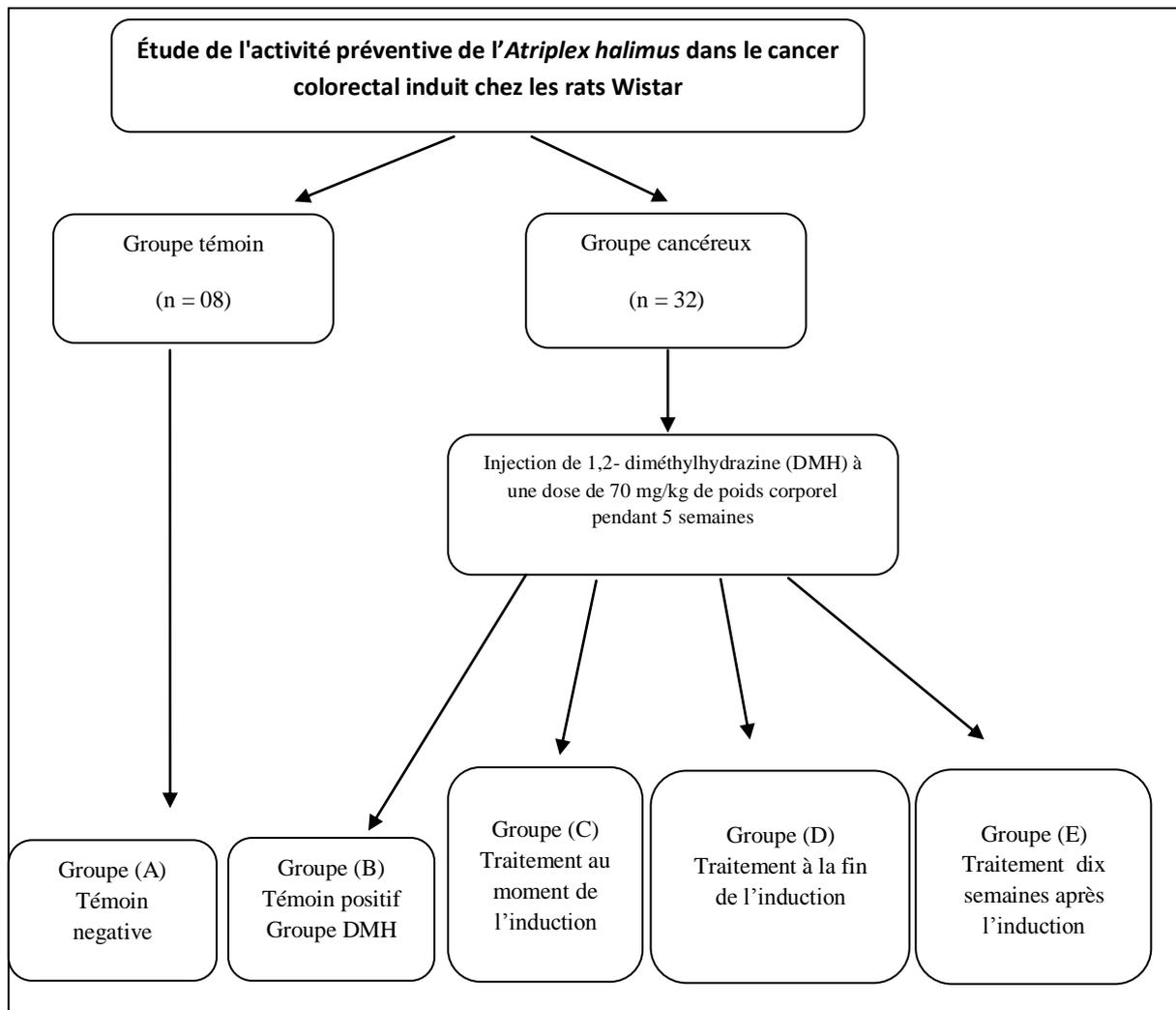


Figure N°15: Schéma récapitulatif de l'étude de l'activité préventif de l'Atriplex halimus

4.2. Traitement curatif:

Selon **Russo (2007)**, un traitement est dit curatif s'il permet d'éliminer totalement la tumeur après son apparition ou encore de limiter l'apparition de nouvelles néoplasies chez des patients déjà traités pour un cancer.

Dans notre étude le traitement curatif a été réalisé suite à l'apparition des tumeurs 30 semaines après l'induction par le DMH.

4.2.1. Le choix du traitement chimio-thérapeutique :

La détermination du traitement chimio-thérapeutique est basée sur l'aspect pathologique (apparition des tumeurs au niveau des colons) et l'évaluation du cas de la maladie par la littérature. Selon **Bird R. P., (1995); Tanaka T., (2009)**, La carcinogenèse du côlon par le DMH est un processus à plusieurs caractéristiques morphologiques et histologiques semblables à celles observées dans la carcinogenèse du côlon sporadique chez l'homme (**Bird R. P., 1995; Tanaka T., 2009**). Ces lésions ont un potentiel progressent vers des adénomes avancés, qui ont la capacité de se transformer en adénocarcinomes (**Tanaka T., 2009**).

Selon **De Filippo C. et al., 1998** les rats induit par le DMH présentent jusqu'à 33% des tumeurs avec des mutations *Apc* responsable des lésions épithéliales dans le cancer colorectal (**De Filippo C. et al., 1998; Blum C. A. et al., 2003**). D'autre part la connaissance du statut *KRAS* est incontournable pour définir la stratégie thérapeutique. Le modèle rat DMH présente des mutations *K-ras* aussi fréquentes que dans la carcinogenèse du côlon humain. (**Otori K., et al., 1995; Takahashi M. et al., 2000; Perse M. et al., 2010; Alabaster O., 1997**).

En collaboration avec les médecins oncologues de l'hôpital de Mascara, le protocole chimio-thérapeutique Xélox (Oxaliplatine 130 mg/kg Xéloxa 1000 mg/kg Beva 7,5 mg/ Kg) a été établi (Tableau 08)

La chimiothérapie (Oxaliplatine 130 mg/kg et Beva 7,5 mg/ Kg) a été injectée aux rats par voie intraveineuse sur la veine caudale (Voir annexe 03). La quantité administrée a été calculée en mg de surface corporelle (m^2) selon la formule suivante :

$$Sc (m^2) = \sqrt{\frac{P \times T}{3600}} ; SC : \text{surface corporelle du malade}; P : \text{le poids corporel}; T : \text{la taille.}$$

L'administration de la Capecitabine Xéloxa se fait par voie orale (gavage) de 1000 mg/ m^2 dissoute dans l'eau distillée 2 fois par jour pendant 14 jours.

Au total 40 Rats Wistar albinos mâle âgée entre 9 à 10 semaine vivaient en condition standardisées ont été utilisés pour la réalisation de cet essai. Les rats ont été répartis au hasard en 05 groupes de huit rats chacun et ont reçu les différents traitements suivant (Tableau 07)

Tableau N° 07: Les différents groupes du traitement curatif

Groupes	Traitement
Groupe A (n°=08)	Contrôle négatif (Sans aucun traitement)
Groupe B (n°=08)	Contrôle Positif DMH (70 mg/kg pendant 5 semaines)
Groupe C (n°=08)	DMH + extrait de la plante (100 mg/kg/jours)
Groupe D (n°=08)	DMH + extrait de la plante (100 mg/kg/jours) + Chimiothérapie Xélox (Oxaliplatine 130 mg/kg Xéloda 1000 mg/kg Beva 7,5 mg/ Kg)
Groupe E (n°=08)	DMH + Chimiothérapie Xélox (Oxaliplatine 130 mg/kg Xéloda 1000 mg/kg Beva 7,5 mg/ Kg)

Tableau N°08: Protocole de chimiothérapie utilisé (Grothey A. *et al.* 2013; Grothey A. *et al.* 2018)

Type de traitement	Médicament	Dose et durée d'administration	Voie d'administration
Chimiothérapie	Oxaliplatine	130 mg/m ² dans 250 ml de NaCl 0,09 % chaque 21 jour pendant (3 cycle)	Par voie intraveineuse (IV)
Thérapie ciblé	Bevacizumab	7,5 mg/ Kg dans 250 ml de NaCl 0,09 % chaque 21 jour pendant (3 cycle)	Par voie intraveineuse (IV)
Chimiothérapie	Xéloda (Capecitabine)	1000 mg/m ² 2 fois par jours pendant 14 jours	Par voie per os (par gavage dans 1 ml d'eau distillé)

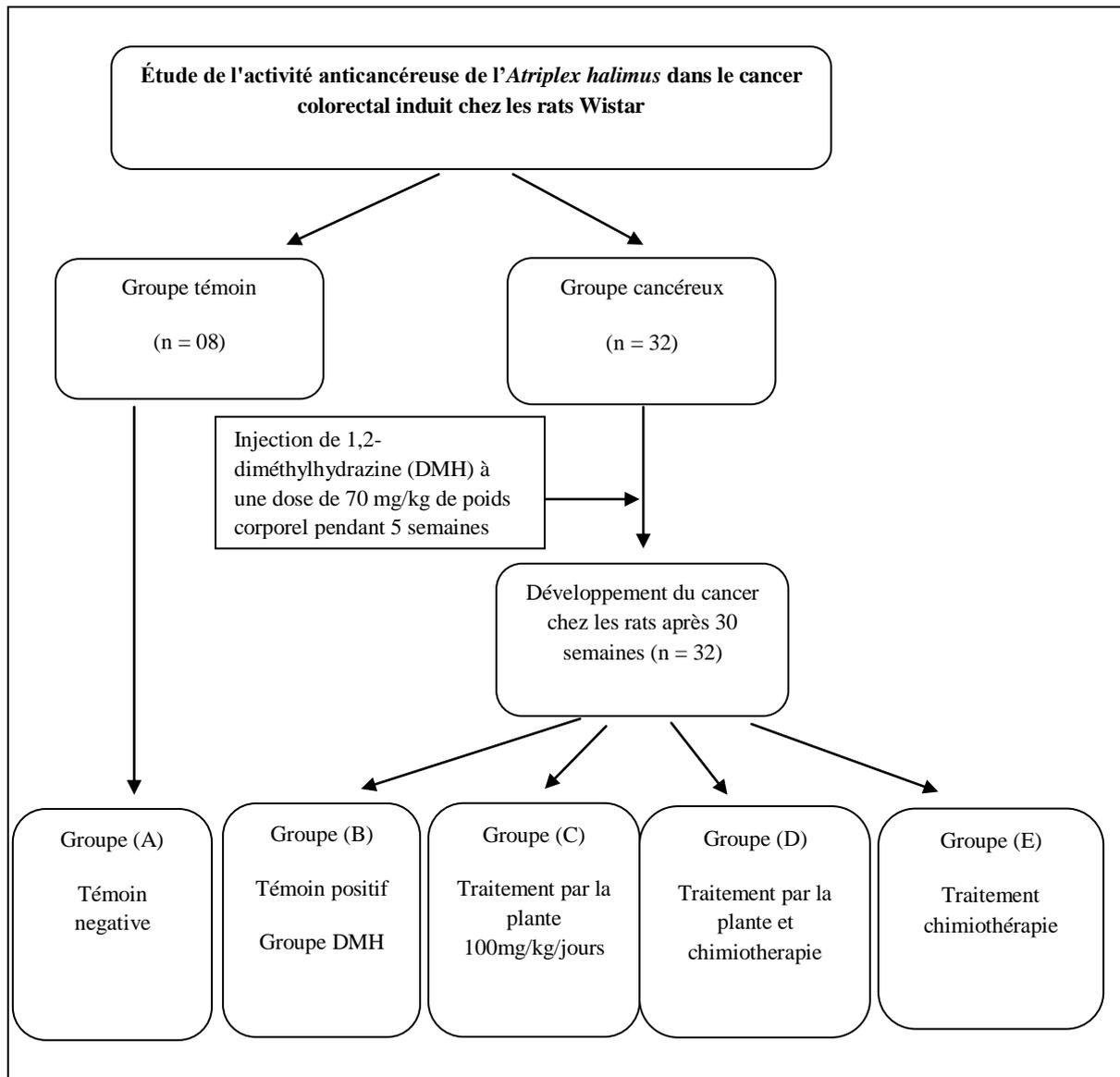


Figure N°16 : Schéma récapitulatif de l'étude de l'activité anticancéreuse par les différents traitements

4.3.Sacrifices et Prélèvement des échantillons :

A la fin des expérimentations tous les animaux d'essai (à jeun la veille) ont été pesés euthanasiés et soumis à une dissection abdominale. Le sang a été prélevé à partir de l'aorte abdominale et récupéré dans des tubes contenant de l'EDTA (Paramètres hématologique), héparine (Paramètres biochimique) et tube sec pour le dosage des marqueurs tumoraux.

Les organes (reins, rate, foie, poumon, cœur) sont observés macroscopiquement in situ, prélevés, pesés pour la détermination du poids relatif.

Les intestins ont été éliminés en bloc du caecum à l'anus et ouvert avec des ciseaux dans la frontière anti-mésentérique.

Les échantillons des colons ont été prélevés et divisé en 03 parties :

- Des colons ont été fixé dans du formaline 10% en vue de l'analyse histologique.
- Des colons fixés à plat dans la formaline 10% et coloré au bleu de méthylène pour Mise en évidence des foyers de cryptes aberrantes ou aberrant crypt foci (ACF)
- Une partie a été nettoyée au sérum physiologique stérile stockée à +4°C et acheminée rapidement au laboratoire pour l'étude de la flore intestinale

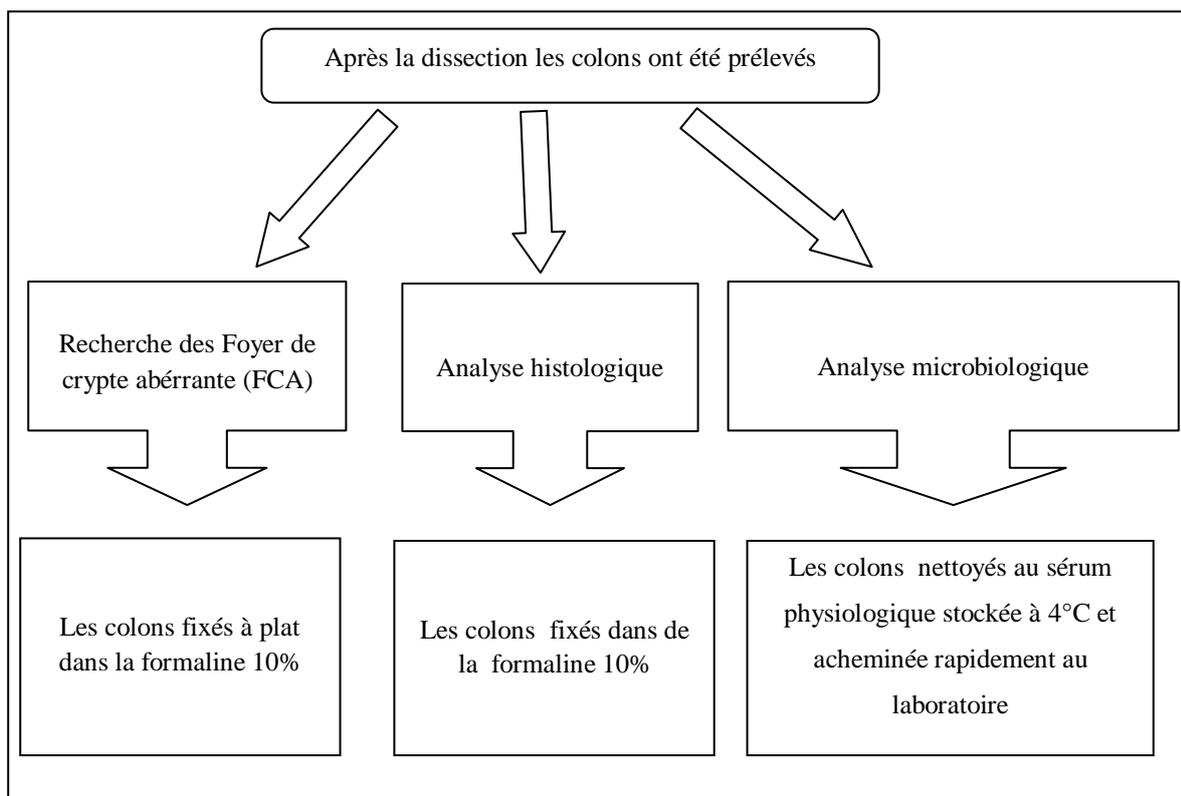


Figure N°17: Les biomarqueurs analysé des colons

4.4. Dosage des marqueurs tumoraux :

Les échantillons de sang prélevé sur tube sec pour le dosage des marqueurs tumoraux ont été centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes puis le sérum a été utilisé pour le dosage de l'antigène CA 19-9 méthode décrite par **Pilo et al. 1996** et l'antigène carcino-embryonnaire ACE méthode de **Uotila et al., 1981**.

Principe :

Le dosage c'est effectué par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) à l'aide d'anticorps monoclonal fondée sur le principe « sandwich » (**Gaillard O., 2001**). Cette méthode utilise un premier anticorps froid fixé sur une phase solide, capturant l'antigène CA 19-9 ou ACE et un deuxième anticorps marqué révélant la liaison antigène anticorps. Les résultats du dosage CA 19-9 sont exprimés en unité internationale millilitre (UI/ml). Les résultats du dosage ACE sont exprimés en nanogramme par millilitre (ng/ml).

4.5. Détermination foyers de cryptes aberrantes (ou aberrant crypt foci ACF):

Le comptage des ACF est un bon outil pour l'évaluation biologique de l'induction ou la modulation de la carcinogénèse colique chez les rats DMH. Etabli par **Bird (1987)** qui à considère les ACF étant des lésions paranéoplasiques du cancer du colon et donc prédictrices de tumeurs. Dans ce cadre, le test a été préconisé afin d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait de *Atriplex h.* sur le cancer colorectal chimio-induit. Les colons réservés à ce test, ont été ouverte longitudinalement (anti-mésentérique) nettoyer avec du sérum physiologique tamponné au phosphate de potassium (0,1 M, pH 7,2) et fixé à plat entre deux feuille de papier filtre face luminale au coté supérieur dans de la formaline 10% pendant 24h (**Hamiza O. O et al, 1994**). Ensuite les colons ont été rincés dans l'eau distillée découpés en longueurs en 2 parties (distal coté rectum et proximal côté cecum) et ainsi coloré au bleu de méthylène 0.05% (**Hamiza O. O et al, 1994**). Les critères ACF recherché lors de l'observation sont les suivant :

- Coloration : plus intense
- Forme : allongée (lumière des cryptes dilatée parfois tortueuse)
- Paroi : épaisse
- Taille : 2-3 fois supérieure
- Structure surélevée
- Regroupement nettement en foyer.

4.6.L'étude histologique des colons :

Après fixation des côlons dans le formol (10 %) pendant 24 heures, les échantillons ont été déshydratés dans 04 bains successifs de 30 min d'éthanol (60°, 70°, 80° et 100°). Les échantillons ont été nettoyés dans du xylène et enrobés dans de la paraffine à 56 degrés pendant 24 heures. Des blocs de paraffine ont été préparés pour être sectionnés sur le site 4 µm à l'aide d'un microtome en traîneau (**Banchroft JD. et al., 2006**).

Les sections de tissus obtenues ont été recueillies sur des lames de verre déparaffinées et colorées à l'hématoxyline-éosine, puis examinées au microscope optique

5. EVALUATION DU MICROBIOTE INTESTINAL

Les colons issus pour la détermination du microbiote colique cultivable ont été nettoyés au sérum physiologique et ouvert dans des conditions stériles, leurs muqueuses ont été grattées à l'aide d'une lame de verre stérile. Les échantillons obtenus de chaque groupe ont servi à la préparation d'une solution mère en addition à la solution Ranger stérile. Les mélanges homogénéisés. En fait par la suite objet de dilutions décimales (de 10⁻¹ à 10⁻⁶) qui seront ensemencé pour les cultures bactériennes dans les milieux sélectifs suivants (Figure18): Gélose nutritive pour la flore aérobie totale, Gélose EMB (Eosine Méthylène Bleu) pour les entérobactéries, Gélose Chapman pour les staphylocoques, Gélose VF (Viande foie) pour Clostridium, Gélose MRS (Man Rogosa et sharpe) pour les lactobacilles et la gélose au sang pour la flore anaérobie totale incubé en condition d'anaérobiose. Par ailleurs, les levures et moisissures ont été isolées sur la gélose OGA (Oxytetracycline- Glucose- extrait de levure). Les résultats ont été exprimés en log unités formant colonie (UFC) par gramme. Selon la formule suivante (**Béraud, 2001**):

$$\text{Log UFC/g d'échantillon} = \text{Log} \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Dilution} \times \text{Volume ensemencé}}$$

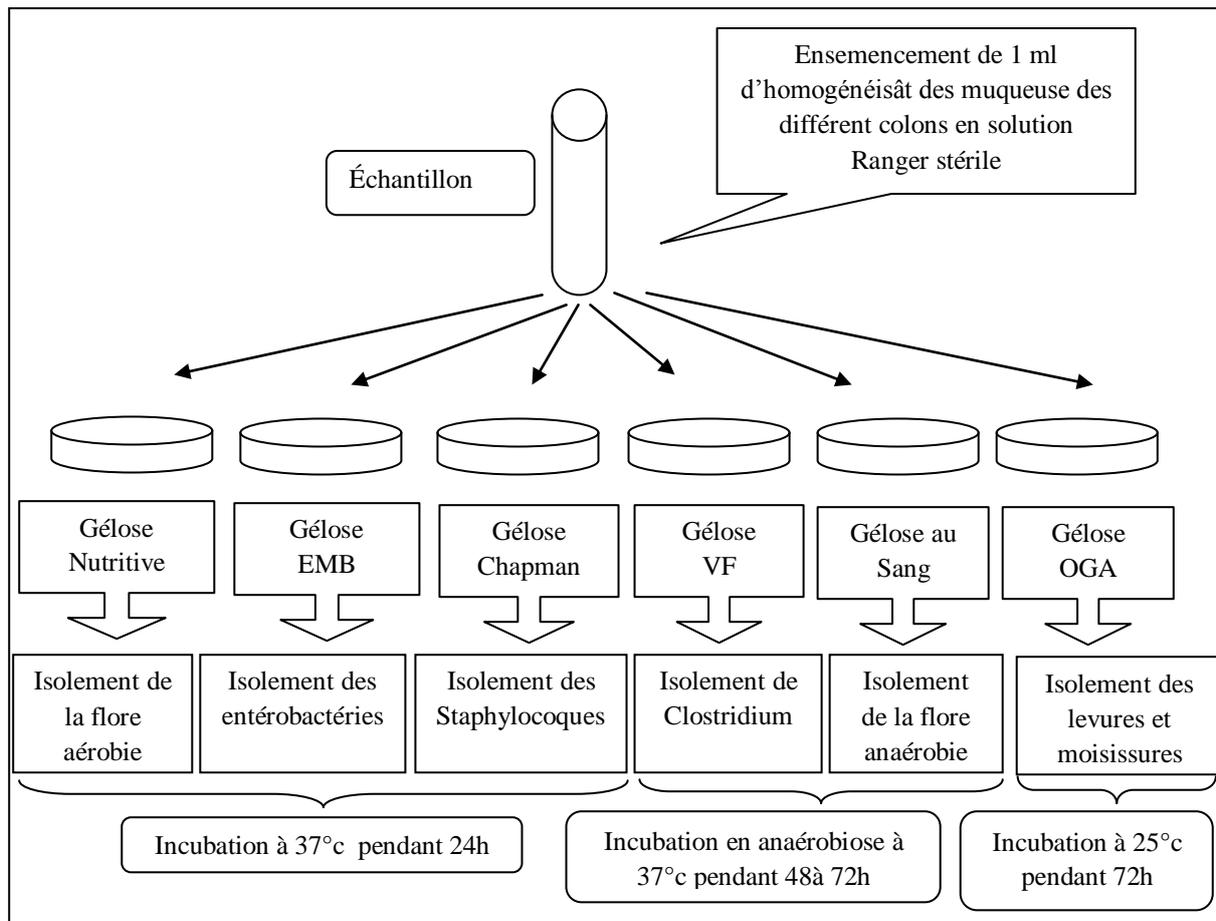


Figure N°18: Techniques d'ensemencement et d'isolement du microbiote intestinal

4.7. Identification du microbiote intestinal:

L'identification des souches a été faite par l'analyse des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques ainsi de que la confirmation de certaines souches par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOFMS.

4.7.1. Identification par méthode MALDI-TOFMS :

La méthode MALDI-TOFMS présente un moyen d'identification fiable et précis des microorganismes en ce basent sur la mesure des composant protéique en comparant le modèle testé à une vaste base de données ouverte, afin de déterminer l'identité du microorganisme jusqu'à l'espèce (Louardi M., 2012).

➤ Principe :

L'analyse des échantillons biologiques par la méthode MALDI-TOFMS nécessite l'utilisation d'une matrice. Le choix de la matrice dépend du type de molécule que l'on souhaite mettre en évidence (peptides, protéines, hydrates de carbone) (**Desoubeaux et al., 2010 ; Bizzini and Greub, 2010**). Sa nature acide favorise l'ionisation des composés. Le complexe (échantillon-matrice) est alors bombardé par un faisceau laser (60 Hz) émettant dans la zone d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin conduit à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon (MALDI= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation). Les ions formés sont alors accélérés dans un champ électrique et dirigés vers un analyseur (le tube de vol, long de 1.0 m) séparant les ions selon leur temps de vol (TOF= Time-Of-Flight). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z (où m = masse et z = charge), les ions atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé (**Sauget et al., 2016 ; 2017**).

➤ Préparation des échantillons :

Pour la réalisation de cette méthode une culture de colonie jeune de 18-24h est nécessaire mélangée avec 1.0 μL de l'acide formique 80% est déposée sur une cible MALDI et recouverte de 1.0 μL de matrice α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). Après séchage, les cibles MALDI sont ensuite chargées dans le spectromètre Microflex LT MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik) et l'analyse est programmée (**Maizi Y., 2021**). Les résultats obtenus sont traité par logiciels (FlexControl, MALDI Biotyper RTC) qui permet un traitement informatique, en comparant les spectres obtenus à ceux référencés dans des bases de données

5. Analyses statistiques :

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne \pm écart-type SD. L'analyse de la variance à été appliquée par le test ANOVA. Les valeurs sont considérées statistiquement significatives à $p \leq 0.05$.

Résultats et Discussion

1. ETUDE ETHNOBOTANIQUE

Les connaissances phytothérapeutiques sont les traditions laissées qui se perpétuent de génération en génération par le biais des coutumes et de la tradition orale, auquel les connaissances des propriétés et l'usage des plantes médicinales est acquise suite à une longue expérience accumulée (Ndjouondo *et al.*, 2015; Anyinam, 1995; Bakiri *et al.* (2016). Ces études sont reconnues aujourd'hui étant les méthodes de choix qui permettent de nous orienter afin de cibler certains tests biologiques (Jones *et al.*, 2000). Dans ce contexte, notre recherche commence par une étude ethnobotanique sur l'*Atriplex halimus* afin de dépister son mode d'utilisation et son usage thérapeutique.

1. Présentation de l'étude:

La présente étude ethnobotanique a enrôlé 200 personnes dont 56% d'hommes et 44% de femmes. L'âge des personnes questionnées varie entre 20 et 78 ans. 91% affirment utiliser les plantes médicinales dont 65% précisent avoir utilisé cette plante.

2. Utilisation thérapeutique de l'*Atriplex h.*:

La convergence d'informations récoltées concernant l'usage thérapeutique de l'*Atriplex h.* montre que cette plante est utilisée dans le traitement d'une gamme de symptômes très variés regroupés en 10 catégories de pathologie résumées dans la (Figure 19), cela traduit l'importance de l'usage thérapeutique de cette plante pour résoudre les problèmes de santé primaire et répondre aux besoins de la médecine domestique.

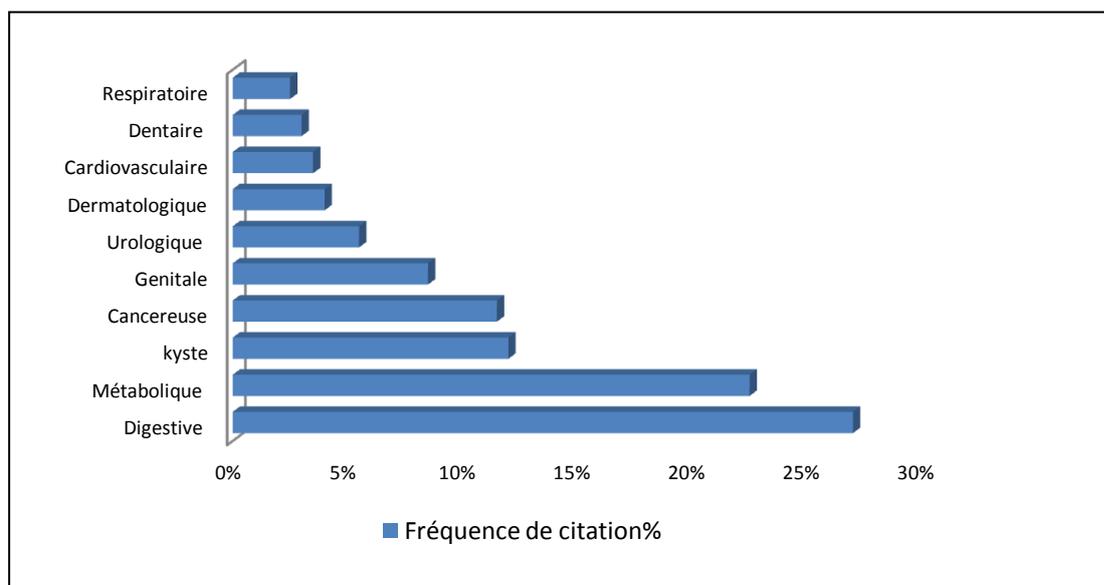


Figure N°19 : Fréquence de citation des pathologies traitées par l'*Atriplex halimus*

Les résultats obtenus nous relatent sur les utilisations les plus fréquentes de la plante: indication massive dans les pathologies digestives avec 27% ainsi que sa large utilisation dans les maladies métaboliques précisant le diabète avec 22.50%, suivi des problèmes des kystes hydatique avec 12%, d'autre par, plus intéressant sont usage dans les pathologies cancéreuse digestive avec 11.5%.

La prédominance de l'usage de l'*Atriplex h.* reste les affections du tube digestif, nous essayerons par la suite à travers certains tests biologiques d'élucider certains effets de cette plante

3. Partie floristique utilisé :

Différentes parties des plantes sont utilisées pour la préparation des traitements thérapeutiques (feuilles, tiges, écorces, graines, racines, fleurs,...etc.) (Figure 20).

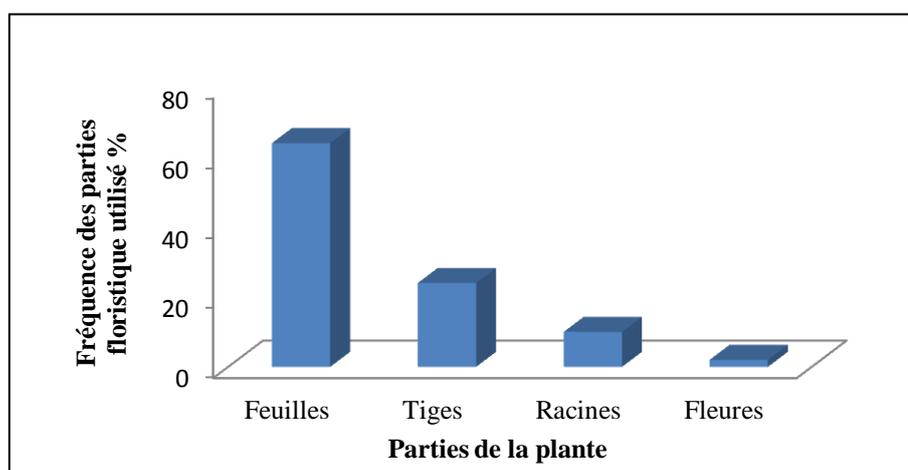


Figure N°20: Fréquence citation des parties floristiques utilisées

Il en ressort de la figure 20 que les feuilles sont les parties les plus utilisées dans l'*Atriplex h.* suivie des tiges, les autres parties sont utilisées avec des fréquences inférieures à 10%. Cette prédominance est due à leurs grandes concentrations en principes actifs. elles sont généralement le siège des réactions photochimiques qui favorisent la biosynthèse et parfois le stockage des métabolites secondaires (**Bahassan et al., 2014**).

Effectivement, La répartition inégale dans les différents organes d'une même plante a été rapporté par plusieurs auteurs (**Fellah et al., 2007 ; N'Guessan et al., 2011 ; El-haci et al., 2012**). Par contre, la biodisponibilité des principe actif varie selon un certain nombre de facteurs : les conditions environnementales comme le degré de salinité et de sécheresse (**Kousri et al., 2011 ; Falleh, 2012**), la localisation géographique (**Ebrahimzadeh et al., 2008**), le stade de maturation et la période de cueillette (**Theerawitaya, 2014**).

4. Mode de préparation :

L'élaboration des traitements à base de plante préconise leur utilisation sous différentes formes selon les modes de préparations : en extraits aqueux (décoction, infusion, macération,...), extraits à l'aide d'autres solvants (huile, vinaigre,...), ou en poudre *etc...*

Les utilisateurs cherchent toujours la méthode la plus simple pour préparer les phyto-médicaments.

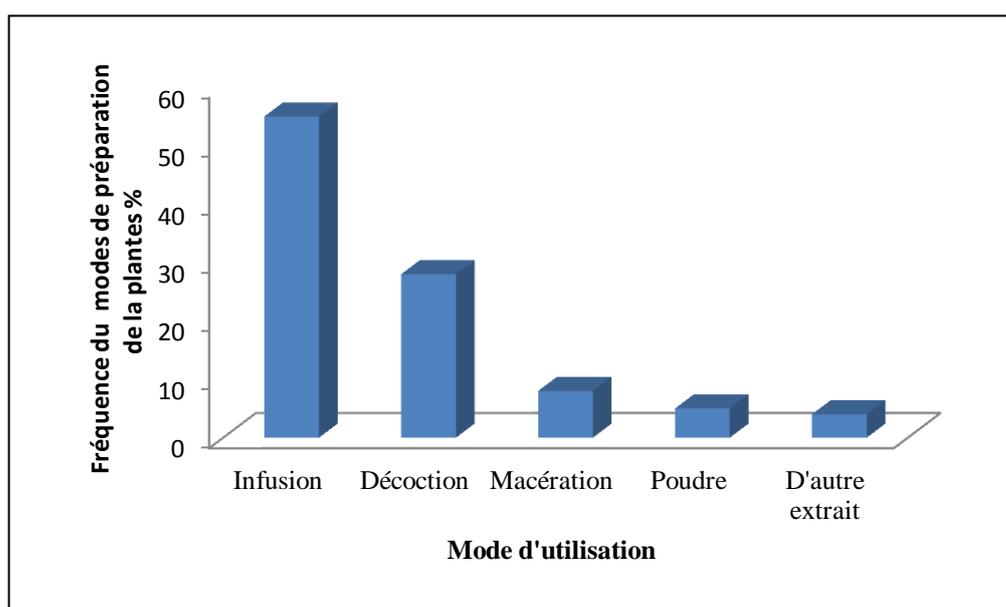


Figure N°21: Fréquences des modes l'utilisation de la plante

L'infusé constitue le mode de préparation le plus courant. L'intérêt de l'infusion dans la préparation des remèdes à base de plantes a longtemps été préconisé par les scientifiques. Ce mode s'applique surtout aux organes délicats de la plante comme (feuilles, sommités fleuries et fleurs) pour préserver au mieux les principes actifs. (Ajibesin *et al.* 2008; Nadembega *et al.*, 2011 et Jdaïdi et Hasnaoui, 2016). Par ailleurs, la recette d'utilisation de l'*Atriplex h.* la plus citée dans cette recherche préconise l'ingestion de l'infusé aqueux d'environ 10g de poudre de la plante 3 fois par jour pendant 30 jours.

2. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

1. Rendements des extractions :

Dans cette étude et suivant les directives de l'enquête ethnobotanique et phytothérapeutique sur la plante les extraits étudiés étaient exclusivement aqueux afin d'éliminer tous effets liés aux solvants organiques qui peuvent interagir dans les traitements préventif ou curatif de la pathologie.

Les résultats des rendements massiques des extraits bruts sont reportés dans le tableau N°09.

Tableau N°09: Rendements des extraits de la plante

Mode d'extraction	Rendement d'extraction %
Macérât	25%
Décocté	25%
Infusion	26%

Les extraits obtenus étaient sous forme de poudre de couleur marron. Le rendement d'extraction des trois méthodes utilisées, représentées dans le tableau 09: ne révèlent pas de différence significatives, Toutefois l'infusion semble être la meilleure méthode d'extraction avec un rendement de 26 % contre 25% pour la décoction et la macération. La comparaison des rendements d'extraction avec la bibliographie est difficile car différentes conditions peuvent l'affecter. Cependant, Le rendement de l'extrait aqueux des feuilles obtenu à froid par **Slama et al. (2018)** est proche des résultats que nous avons obtenus (27,23%) les auteurs ont également démontré que le rendement de l'extrait aqueux est nettement supérieur à celui obtenu par différent solvant.

Dans la plupart des cas, le rendement d'extraction varie en fonction de l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, la richesse de chaque espèce en métabolites dépend aussi du type de solvant utilisé (**Digheche et Khalfallah., 2019**). La méthode d'extraction est un facteur qui influence l'efficacité de l'extraction des polyphénols, la composition de l'échantillon, la température et le temps d'extraction sont aussi des facteurs déterminants du rendement (**Do et al., 2014**).

2. Criblage phytochimique :

Les résultats des tests de détection de quelques groupes chimiques responsables des effets thérapeutiques sont regroupés dans le tableau N°10.

Tableau N°10 : Tests phytochimique d'extrait aqueux de l'*Atriplex halimus*

Famille chimique	Extrait aqueux
Les polyphénols	+
Les tannins	+
Les flavonoïdes	+
Les coumarines	-
Les alcaloïdes	+
Les triterpinoïdes	+
Les saponines	+++

- : absence, + : présence

Il ressort des analyses effectuées la présence de polyphénols, flavonoïdes, Alcaloïde, et des saponosides et l'absence des coumarines, dans tous les échantillons (Tableau 10) ces résultats sont similaire a ceux trouvés par **Chikhi I. (2013)**; **Benhammou et al (2009)** et **Emam (2019)**.

Ces métabolites secondaires ont un large panel d'activités biologiques, et sont probablement à l'origine des vertus médicinales de l'*A. halimus*. Ce qui expliquerait son indication phytothérapeutiques.

Les polyphénols sont des composés naturels dotés d'un pouvoir antioxydants grâce à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir soit comme des agents réducteurs (donneurs d'hydrogène), piègeurs de l'oxygène singulet ou des chélateurs de métaux (**Rice-Evans et al., 1997 ; Ahmadi et al., 2007**). En outre, Les flavonoïdes sont aussi des excellent antioxydants réputés (**Torel et al., 1986; D'abrosca et al., 2007**). Ils sont aussi des antiulcéreux, antitumoraux, antispasmodiques, antisécréteurs et antidiarrhéiques (**Di Carlo, 1999**), antiallergiques, anti-inflammatoires, hypotenseurs et protègent du cancer (**Bruneton et al., 2007**). D'autre part, Les tanins permettent de lutter contre les infections et ainsi leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus pourraient expliquer leur emploi dans les plaies. Les tanins expriment les propriétés de la vitamine P, ils renforcent les vaisseaux sanguins et contribuent à l'accumulation de la vitamine C dans l'organisme (**Lazurevskii et al., 1966**). Les saponosides ont un effet cicatrisant. les stérols et les polyterpènes ont des propriétés bactéricides (**Lazurevskii et al., 1966**).

3. Identification des composés phénoliques de l'extrait d'infusion par HPLC :

L'analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques de l'extrait aqueux ont été réalisées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sur un Système LC Prominence-i LC 2030C. Les molécules détectées sont reportées dans la Figure N°22 et le Tableau N°11, les résultats obtenus ont été identifiés en comparaison avec ceux rapportés dans la littérature.

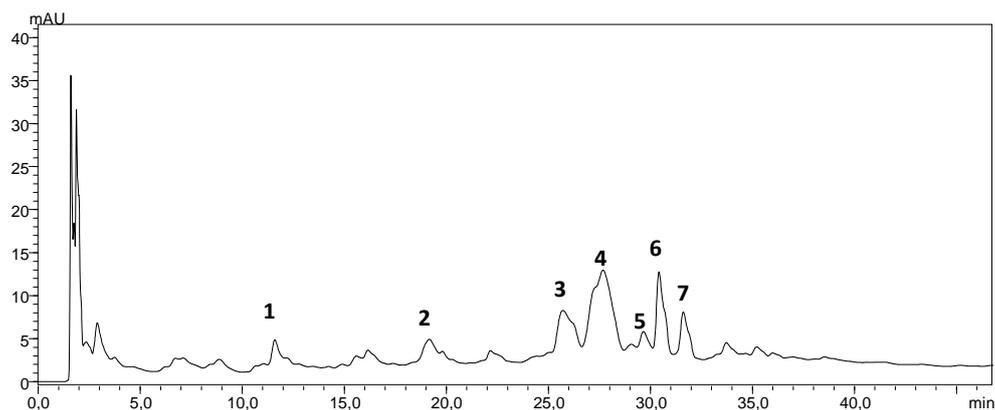


Figure N°22: Identification des composés phénoliques de l'extrait d'infusion de *A. halimus*. 1) L'acide galique, 2) L'acide protocatechique, 3) L'acide *p*-coumarique, 4) Catechine, 5) Epicatechine, 6) Rutine, 7) Isorhamnetine glycoside

Tableau N°11: Composés phénoliques de l'extrait d'infusion de l'*Atriplex halimus* analysé par HPLC sur Système LC Prominence-i LC 2030C

Pics	Temps de rétention	λ max	Quantité ($\mu\text{g/g DM}$)	Composants phénolique
01	11.596	215-270	13.59	L'acide galique
02	19.170	261	27.9	L'acide protocatechique
03	25.709	230-311	59.41	L'acide <i>p</i> -coumarique
04	27.678	278-325	717.86	Catechine
05	29.675	252-345	35.12	Epicatechine
06	30.417	255-354	360.84	Rutine
07	31.609	252-353	83.33	Isorhamnetine glycoside

Les résultats obtenus présentent un polymorphisme des molécules phénoliques, au total sept composés ont été identifiés dont 3 acides phénoliques et le reste des flavonoïdes. Le composé le plus éminent est la Catechine avec un taux de (717 $\mu\text{g/g DM}$) suivie de: Rutine (360,84 $\mu\text{g/g DM}$), Isorhamnetine glycoside (83,33 $\mu\text{g/g DM}$), L'acide *p*-coumarique (59,41 $\mu\text{g/g DM}$), Epicatechine (35,12 $\mu\text{g/g DM}$), L'acide protocatechique (27,9 $\mu\text{g/g DM}$), L'acide galique (13,59 $\mu\text{g/g DM}$). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Emam (2019)**

D'après **Petti & Scully (2009)**, les composés polyphénoliques les plus importants dans les plantes sont les acides phénoliques et les flavonoïdes.

Ebrahimzadeh et al., (2008), rapportent que la différence des composés d'une même espèce d'un auteur à un autre sont dues à : l'origine, la variété, la saison de récolte, la localisation géographique. La maturité de la plante joue aussi un rôle important dans leurs compositions et teneurs. Alors que, selon **Park et Cha., (2003)** les conditions climatiques des endroits où elles poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité) stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires. D'autre part, **Falleh et al. (2008)** indique que la distribution des métabolites secondaires change pendant le développement de la plante ce qui dépend donc de la période de récolte.

4. Dosage du contenu phénolique des extraits :

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives très recherchées, car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes,... etc.). Pour ces raisons, les extraits bruts, obtenus par extraction aqueuse ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre pour leur contenu en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés. Les résultats du dosage sont décrits dans le tableau N°12.

Tableau N°12: Contenu polyphénolique des extraits aqueux de l'*Atriplex halimus*

les extraits	Polyphénols totaux (mg EAG /g MS)	Flavonoïde (mg EQ/g MS)	Tanins condensés (mg ECAT/g MS)
Décocté	11,75 ±0.009	225 ±0.05	142 ±0.11
Infusé	12±0.015	223±0.05	20 ±0.007
Macérât	9,5±0.009	224± 0.040	24 ±0.014

L'examen des résultats obtenus montre que les extraits aqueux de l'*Atriplex halimus* possèdent des teneurs en phénols totaux significativement différentes en relation étroite avec la méthode d'extraction. L'infusé présente le taux le plus élevé 12±0.015 mg EAG /g MS alors que le macérât présente la teneur la plus inférieure de 9,5±0.009 mg EAG /g MS ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Chikhi I. (2013)** avec un taux d'environ 12,47 mg EAG /g MS. Paradoxalement, ces résultats sont inférieurs à ceux détectés par **Bouchoucha et Ouazeta (2018)** qui ont trouvé une valeur de 27,04 mg EAG /g MS et de **Rached (2009)** avec une valeur de 16.50 mg EAG /g MS et aussi supérieurs de ceux de **Samira et al.,2015** qui est de l'ordre de 3,648 mg EAG /g MS.

Les résultats du dosage des flavonoïdes montrent leurs abondances. L'extrait le plus riche atteint une teneur de 225 ±0.05 mg EQ/g MS par la méthode de décoction suivie des teneurs de (223±0.05 mg EQ/g MS, 224± 0.040 mg EQ/g MS) respectivement pour l'infusé et le macérât. Comparativement à d'autres études, nos résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenus par **Bouchoucha et Ouazeta (2018)** de l'ordre de 7.691mg ER/g Ex et de ceux de **Rached (2009)** d'une valeur de 16.41mg ECAT/g Ex.

Par ailleurs, Le dosage des tanins montre des différences significatives. La méthode de décoction présente la teneur la plus importante 142 ±0.11 mg ECAT/g MS. Cependant la méthode d'infusé et macérât présente des teneurs basses (20 ±0.007 mg ECAT/g MS, 24 ±0.014 mg ECAT/g MS) respectivement. Comparativement à d'autres études, nos résultats

sont supérieurs à ceux obtenus par **(Belhadj Tahar.S et al., 2015)** qui ont trouvé 0.122 mg EC/ g MS dans la fraction acétate d'éthyle et 0.039 mgEC/ g MS dans la fraction dichlorométhane. Alors que **Benhammou N., (2012)** a trouvé des valeurs de l'ordre de 1.421mg EC/mg d'extrait méthanolique. D'après ces derniers, On constate que l'extrait aqueux de l'*Atriplex h.* est plus riche en tanins condensés que les extraits utilisant les solvants.

La variabilité des teneurs des composés phénoliques chez les espèces végétales sont selon **Ebrahimzadeh et al. (2008)** dues aux parties végétales testées et au facteur génétique. D'autres auteurs les affectent à la composition phénoliques des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), aux conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (**Ksouri et al., 2008**), la nature du sol, le type du microclimat et aussi aux étages bioclimatiques où poussent ces plantes (**Atmani et al., 2009**).

Des études menées par **Vinson et al. (2005)** et **Al-Farsi et al. (2005)** indiquent que la température élevée et une forte exposition à la lumière du soleil augmentaient la biosynthèse des composants phénoliques. En outre, Les basses températures activent le stress oxydatif auquel les cellules végétales doivent s'en débarrasser en produisant des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non enzymatiques, en particulier les composés phénoliques (**Kirakosyan et al., 2003 ; Imahori et al., 2008 ; Ruelland et al., 2009 ; Sevillano et al., 2009 ; Lianopoulou & Bosabalidis, 2014 ; Lianopoulou et al., 2014 ; Gupta et al., 2019**). De ce fait l'*Atriplex h.* issue de collecte des régions Saharienne adapté à des alternances de chaud-froid diffère en composition et en concentration des composés phénoliques de l'*Atriplex h.* récolté des régions méditerranéenne exposé au stress de salin.

Par ailleurs, Le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu, implique le dosage de toutes les molécules réductrices, comme les sucres réducteurs ou la vitamine C, ce qui par conséquent rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols (**Fukushima et al., 2009**).

En conclusion, d'après ces résultats, on constate que les extraits sont plus riches en flavonoïdes qu'en polyphénols.

5. Pouvoir antioxydant des extraits :

Les plantes médicinales présentent une source inépuisable de composé bioactifs à pouvoir antioxydants naturels. Ils sont capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme (**Bouhadjra, 2011**). Ces dernières décennies de nombreuses études à travers le monde ont démontré l'implication des antioxydants dans la lutte contre diverses pathologies chroniques, telles que le cancer, le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives...etc. Plusieurs méthodes sont utilisées pour les évaluer, *in vitro* et *in vivo*. Dans cette recherche le test DPPH a été préconisé afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits. Les résultats sont résumés dans le tableau N°13:

Tableau N°13: le pouvoir antioxydant des extraits de l'*Atriplex halimus* par test DPPH

Les extraits	L'acide ascorbique	Décocté	Infusé	Macérât
IC50 (mg/ml)	0.005±0.001	0.29±0.01**	0.85±0.02**	1.52±0.002**

Les valeurs IC50 sont exprimées en moyennes ± SD. Les valeurs montrent des différences significatives entre les échantillons et l'acide ascorbique à P < 0,001.

A la lumière des résultats obtenus à travers le test DPPH. La valeur d'IC50 la plus faible indique une l'activité antioxydante la plus élevée. De ce fait, nous avons constaté que le décocté présente l'activité antioxydante la plus importante entre les trois extraits avec une IC50= 0,29 mg/ml suivie de l'infusé et le macérât avec des IC50 de (0,85 et 1,52 mg/ml) respectivement. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par **Slama et al. (2018)** dans l'extrait méthanolique des feuilles avec une IC50 de l'ordre de 0.53 mg/ml et ceux obtenu par **Samira B et al., (2015)**. Par contre d'autre étude ont trouvé de faible capacité antioxydante tel que l'étude de **Boulaouad et al., (2018)** avec une valeur d'IC50 plus élevé égale à (11.39 mg/ml) et **Benhammou et al., (2009, 2014)** qui montrent aussi que l'activité antiradicalaire contre le radical DPPH des extraits méthanoliques préparés à partir des feuilles et des tiges d'*A. halimus* est très faible avec des valeurs élevées des IC50 obtenues (31.83 et 20,58 mg/ml) respectivement.

De ce fait, la variation du pouvoir antioxydant des extraits pourrait s'expliquer par leur différence en composé phénolique, car l'activité scavenger du radical DPPH dépend de la structure et la polarité des polyphénols, la présence d'hydrogène phénolique et le nombre de

groupements donneurs d'hydrogène (**Dawidowiez et al., 2006**), exclusivement, les groupements OH en 3', 4' sur le noyau B et/ou un OH libre des flavonoïdes (**Amic et al., 2003**). D'après **Bylka et al. (2001)** le pouvoir antioxydant chez *Atriplex halimus* est accordé à l'abondance des flavonols (keampferol, quercetin). Ces métabolites secondaires et leurs bio-activités peuvent être affectés par plusieurs facteurs tel que les changements climatiques (**Lemos et al., 2015 ; Prinsloo & Nogemane, 2018**), la région, la saison et la période de récolte, ainsi que la partie de la plante. D'autre chercheurs suggèrent que la production de ces substances antioxydante sont le résultat du stress abiotiques (**Lianopoulou & Bosabalidis, 2014 ; Khan et al., 2015 ; Saema et al., 2016**) car les polyphénols qui sont considérés comme des agents antioxydants et chimio-préventifs intéressants, sont primordiale à l'adaptation de la plante aux changements environnementaux (**Baser, 2002 ; Edreva et al., 2008 ; Piccolella et al., 2018**).

En conclusion, L'analyse des extraits aqueux des parties aériennes de l'*Atriplex h.* Montrent que cette espèce est une source potentielle de composé phénolique et dotée d'un remarquable effet antioxydant

3. ETUDE DE LA TOXICITE

Afin de déterminer la dose d'extrait d'*Atriplex h.* nécessaire à utiliser en traitement, Une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques été préconisée (Figure 23)

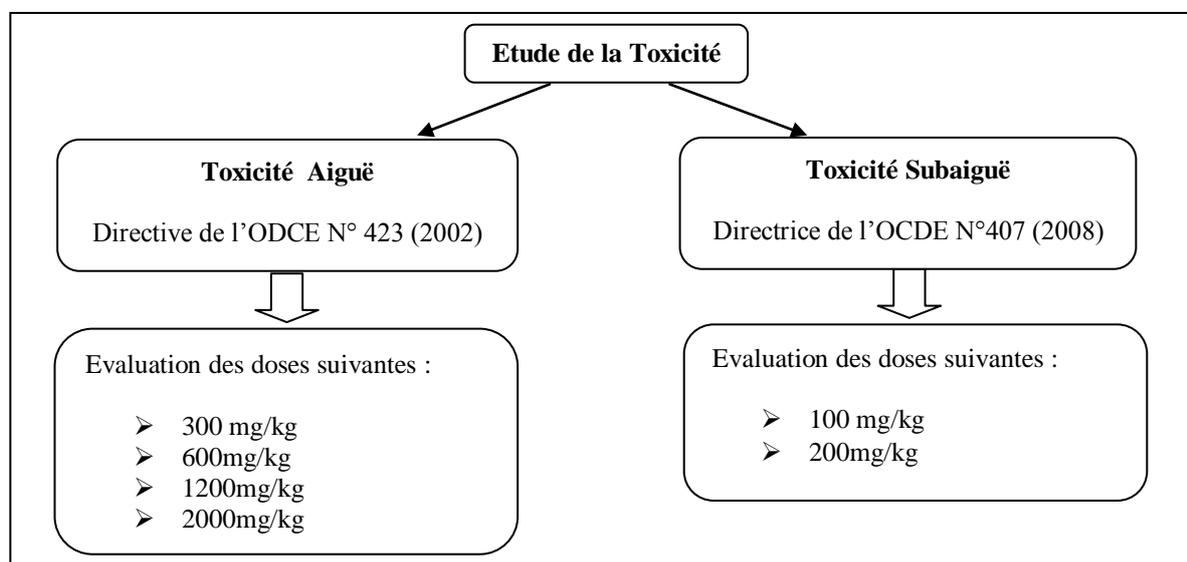


Figure N°23 : Schéma récapitulatif de l'étude de toxicité

1. Toxicité aiguë :

L'état clinique des rats traités avec les différents extraits été exempté de symptômes graves. Aucune mortalité et aucun signe de toxicité n'a été observé. Ce qui implique que la valeur médiane de la dose létale 50 (DL₅₀) des extraits d'*Atriplex h.* par voie orale est supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel.

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience (Figure 24) a démontré une perte significative de poids corporel en fonction de la dose, en particulier aux doses élevées de 1200 et 2000 mg/kg de poids corporel par rapport au groupe Témoin ($p < 0,05$).

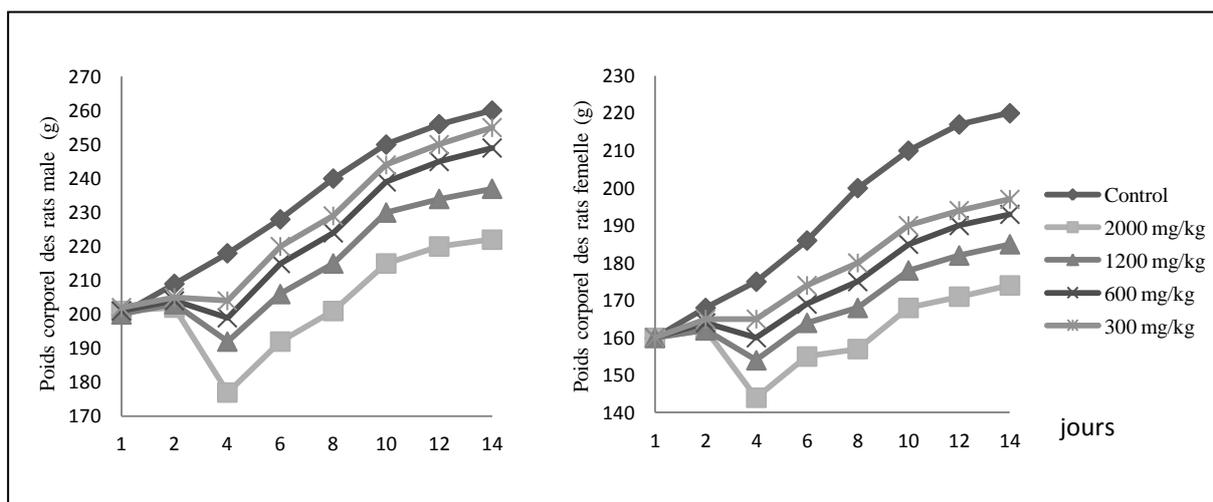


Figure N°24 : Evolution pondérale des rats des deux sexes dans les conditions de la toxicité aigue

2. Toxicité subaiguë :

L'évaluation des extraits d'*Atriplex h.* pendant 28 jours de traitement (Figure 25-A) par les doses 100 et 200 mg/kg de poids corporel ne montrent aucune mortalité ni aucun effet néfaste. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Chikhi I et al (2014)**. L'évolution pondérale des rats vis-à-vis des doses utilisées ne montre pas de changements significatifs à la dose de 100 mg/kg. Par contre, la dose 200 mg/kg provoque une diminution significative ($p < 0,05$) du poids corporel qui est plus marquée chez les rats femelle.

L'examen des organes prélevés à la fin des traitements par les extraits (Figure 25-B) ne montre aucun dommage visible ni aucune variation significative sur leurs poids relatifs des organes à la dose 100 mg/kg. Cependant, le foie des rats traité par la dose 200 mg/kg présente une diminution significative ($p < 0,05$) du poids relatif chez les deux groupes mâle et femelle.

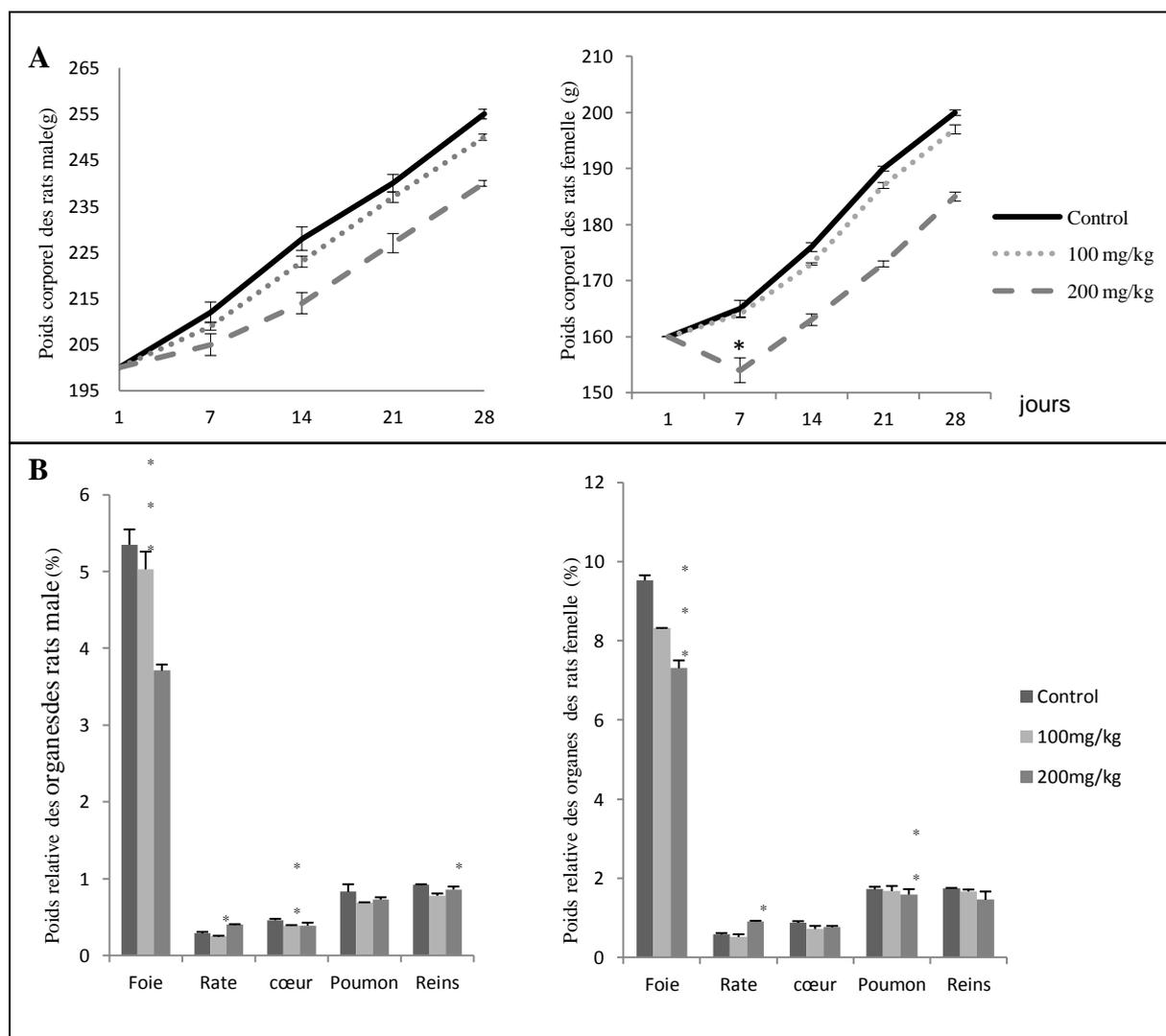


Figure N° 25: Effet de l'*Atriplex h* sur, **A)** L'évolution pondérale, **B)** Poids relatif des organes des rats dans les conditions de la toxicité subaiguë. Les différents groupes sont comparés au groupe témoin. * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001

L'étude sérique effectuée sur les prélèvements issus de l'utilisation des extraits de l'*Atriplex h*. avec les doses 100 et 200 mg/kg de poids corporel sur les paramètres biochimiques rénaux et hépatique (Tableau 14) ne révèlent pas de déséquilibre de la fonction rénale à la dose 100 mg/kg. Par contre, Une légère augmentation significative a été constatée dans l'urée chez les groupes traités par la dose de 200 mg/kg.

Zeghib et al. (2019) On rapporté que l'extrait de l'*Atriplex h* à un effet néphroprotecteurs utilisé en traitement curatif et préventif sur la néphrotoxicité induite par le benzène chez les rats.

D'autre part, Les paramètres hépatique ont montré une augmentation significative ($P \leq 0.05$) des valeurs de TGO, TGP surtout chez les rats traité par la dose 200mg/kg. Tandis qu'une diminution significative des PAL et toujours plus accentué chez les groupe traité par la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Zeghib et al. (2019) Ont démontré que l'*Atriplex h* a un effet hépato-protecteur sur la toxicité induite par le benzène chez les rats. L'extrait de la plante administré comme traitement a permis de restauré de manière significative l'activité enzymatique hépatique et ainsi inhibé les lésions hépatiques causées par le benzène.

En outre, Une hypolipidémie a été observée avec une baisse proportionnelle des valeurs de cholestérol total et de triglycérides qui est due à la présence de quelques polyphénols et flavonoïdes dotés de propriétés anti hyperlipidémique

Les paramètres hématologiques ont étaient marquées par une diminution légère non significative du nombre de globules blancs chez les males (Tableau 15), contrairement au femelles qui présentaient des diminutions significative chez les groupe traité par les deux dose, ainsi qu'une hausse des valeurs de l'hémoglobine et de l'hématocrite à la dose de 200mg/kg.

À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude toxicologique, nous constatons que l'administration de 100 mg/kg d'extrait de plante n'a pas eu d'effets délétères sur les animaux traités et ne présentent aucun signe d'intoxication au cours des 28 jours de test. La dose 100 mg/kg de poids corporel a donc été sélectionnée pour l'étude de l'activité anticancéreuse.

Tableau N°14: l'effet des l'extraits de l'*Atriplex h.* sur les paramètres biochimique au cours de la toxicité subaiguë.

Paramètres	Groupes					
	Témoin	Male		Témoin	Femelle	
		100 mg/kg	200 mg/kg		100 mg/kg	200 mg/kg
TGO (UI/l)	135,28±2,0	141,75±2,40**	169,73±2,6***	20,5±2,12	28,33±1,52***	129,75±3,8***
TGP (UI/l)	79,85±1,27	64,03±1,9***	31,87±2***	25,5±0,70	36,01±2***	50,41±1,59***
PAL (UI/l)	377,9±2,53	267,46±2,44***	217,69±2,59***	46,64±4,65	51,11±0,47	71,78±0,72***
Urée (mg/dl)	35±0,007	40±0,07	47±0,03***	35±0,007	40±0,005	46±0,01***
Creatinine (mg/dl)	605±0,5	712±0,53	856±0,68	1295±0,07	933±0,28***	556±0,15***
Chol (g/l)	0,70±0,007	1,30±0,05	1,15±0,06	1,85±0,007	1,75±0,03***	0,79±0,01***
TG (g/l)	2,03±0,03	0,88±0,07***	1,20±0,1***	0,86±0,05	0,74±0,005	0,61±0,01***

TGO (Glutamate-oxaloacetate-transaminase), TGP (Glutamate-pyruvate-transaminase), PAL (Phosphatase alcaline), Chol (cholestérol totale), TG (Triglycérides totales). Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SD, n = 6. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 par rapport au témoin non traité.

Tableau N°15: l'effet des l'extraits de l'*Atriplex h.* sur les paramètres hématologiques au cours de la toxicité subaiguë.

Paramètres	Groupes					
	Témoin	Male		Témoin	Femelle	
		100 mg/kg	200 mg/kg		100 mg/kg	200 mg/kg
Globule blanche (mm ³)	9.61±0.01	9.08±1.08	7.51±2.1	5.65±0.21	6.56±0.05***	6.01±0.06***
Globule rouge (mm ³)	11.39±0.02	10.15±1.91	10.17±1.81	5.74±0.93	6.86±0.91***	9.91±0.16***
Hémoglobine (G/dl)	18.05±0.21	16.44±0.94	17.23±2.40	10.75±1.32	13.23±1.97	14.8±0.2*
Hématocrite (%)	65.57±0.67	57.22±7.19	57.27±2	38.65±2.57	42.02±2.95	52.98±1.93***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SD, n = 6. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 par rapport au témoin non traité.

4. EVALUATION *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE L'ACTIVITE DE L'*Atriplex halimus* SUR LE CANCER COLORECTAL CHIMIO-INDUIT

Dans notre étude le 1,2 diméthylhydrazine (DMH) a été utilisé pour induire le CCR chez les rats Wistar afin d'évaluer l'effet préventif ou curatif que peut avoir l'*Atriplex halimus*. Deux types de traitements à base d'extrait de la plante ont été utilisés (Figure 26) un traitement préventif et un traitement curatif.

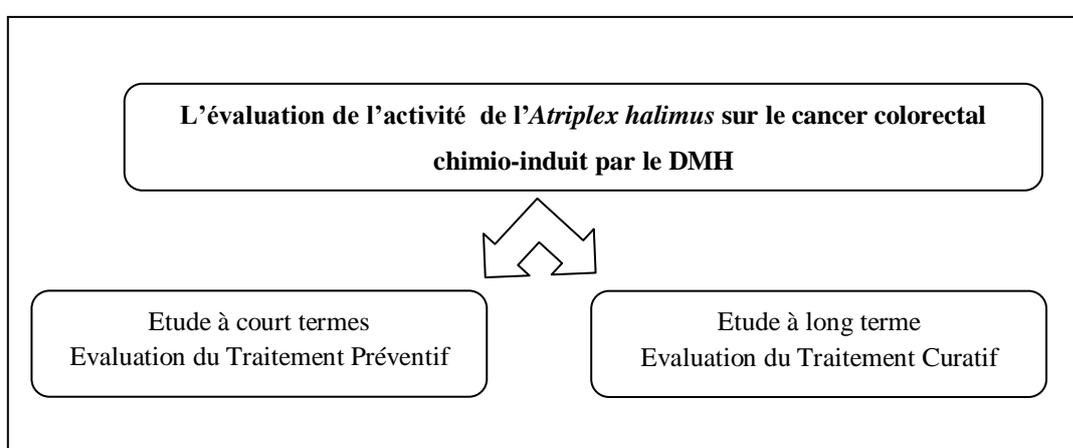


Figure N°26 : Schéma récapitulatif de l'évaluation de l'activité de l'*Atriplex halimus* sur le cancer colorectal chimio-induit par le DMH.

4.1. Evaluation du traitement préventif :

Dans cette recherche l'évaluation de l'effet de l'*Atriplex h.* sur le cancer colorectal a d'abord été préconisée en traitement préventif à différents temps lors de l'induction du CCR.

L'extrait de la plante a été administré à T0 lors du début de l'induction (au même temps que le DMH), à T5 à la fin de l'induction (5 semaines après l'induction) et à T15 après 10 semaines de l'induction.

Effectivement, Le traitement chimiopréventif peut commencer à différents moment de la cancérogénèse. Ces protocoles sont utilisés pour évaluer les effets promotionnels ou protecteurs du facteur testé (Femia A. M. et Caderni G., 2008). Selon Corpet D. E. et Pierre F., (2005) et Wargovich M. J. *et al.*, (2000) Un agents préventif naturel permet de bloquer ou d'attenué le processus de cancérogénèse. Ce que nous essayerons de recherché à travers ces essais.

4.1.1. L'évolution du poids corporel suite au traitement préventif :

L'évolution du poids corporel des rats suite aux différents traitements (Figure 27-A) montre des changements pondéraux relatifs à l'induction par le DMH et à l'administration de l'extrait de la plante. Effectivement, tous les rats DMH ont présenté une diminution du poids lors des cinq semaines d'induction par rapport au groupe témoin. Cette diminution pondérale est sans doute due à l'action du DMH. Toute fois, les rats traités par l'extrait de l'*Atriplex h.* ont subi également une diminution significatif ($p \leq 0.05$) du poids tous au long de la période du traitement.

En outre, une reprise pondérale a été observée chez tous les rats à la fin de l'induction et du traitement.

Selon **Hilaly et al., (2004)** Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques. Ainsi, **Mukinda & Syce, (2007)** démontre que la perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal.

Ces résultats concorde avec ceux obtenu par **Venkateshwarlu E et al., (2014)** dans leurs étude sur l'évaluation de l'effet anticancéreux *Annona muricata* dans le CCR induit chez les rats par DMH, Ils rapportent que le gain de poids corporel et le taux de croissance étaient significativement faibles ce qui été due à l'induction par le DMH.

4.1.2. L'évaluation du poids relatif des organes suite au traitement préventif :

L'analyse des prélèvements des organes ne montre pas d'aspect morphologique différent de celui des rats témoins. Alors que, le poids relatif (Figure 27-B:) montre des augmentations significatives ($P \leq 0.05$) du poids du foie, la rate et des poumons chez les rats DMH comparé au groupe témoin. En outre, Des différences significatives ont été observées chez les rats traités par l'extrait de la plante comparé au groupe DMH, Ces résultat sont comparable a ceux de **Venkateshwarlu E et al., (2014)** qui montrent que le poids du foie des rats DMH a significativement augmenté de celui des rats témoin. Ces résultats sont justifiés par la toxicité hépatique due à la métabolisation du DMH au niveau du foie. Effectivement, selon (**Fiala E. S. et C. Stathopoulos C., (1984)**) le DMH est métaboliquement activé dans le foie par une série de réactions à l'intermédiaire azoxymethane (AOM) puis au methylazoxymethanol (MAM) qui sera métabolisé en cancérigène ultime hautement réactif en ion methyldiazonium,

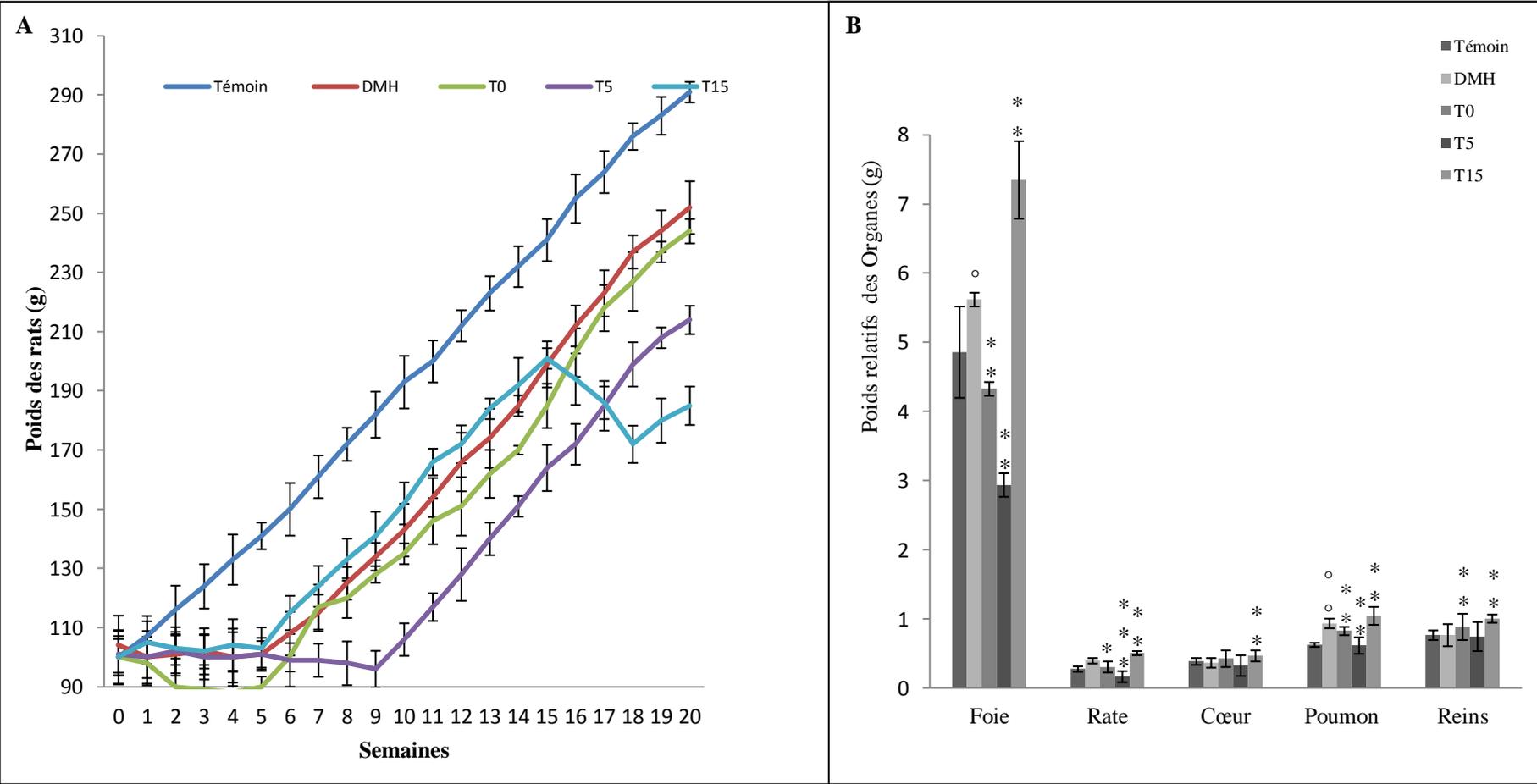


Figure N° 27: Effet de l'activité de l'*Atriplex halimus* dans l'étude du traitement préventif **A)** Le poids des rats, **B)** Le poids relative des organes. °≤0.05, °°≤0.01, °°°≤0.001 comparé au groupe témoin et *≤0.05, ** ≤0.01, ***≤0.001comparé au témoin positif (DMH).

4.1.3. Paramètre biochimique suite au traitement préventif :

A l'issue du traitement préventif les paramètres biochimiques (Figure 28) montrent des différences dans les trois bilans recherchés

Une augmentation significative ($p \leq 0.05$) des transaminases TGP et TGO a été observée chez les rats DMH comparé au groupe témoin (Figure 28-A)

Les transaminases sériques sont considérées comme des indicateurs sensibles des lésions hépatiques. L'atteinte hépatique est indiquée par une augmentation des taux de TGP et TGO. Ces changements résultent des fuites enzymatiques des hépatocytes. Les augmentations des niveaux de transaminases par les carcinogènes sont cohérentes à ceux rapporté par **Visen *et al.*, (1993)**

L'Administration de l'extrait de la plante ne semble pas améliorer ces taux de transaminases. De plus, une augmentation significative ($p \leq 0.001$) est été observée chez les rats ou le DMH a été administré en même temps que l'extrait de la plante.

Le bilan rénal (Figure 28-B) montre aussi des augmentations significatives ($p \leq 0.001$) des taux d'urée créatinine chez les rats DMH comparé au groupe témoin, ce qui témoigne d'une atteinte de la fonction rénale. Cette dernière est nettement améliorée ($p \leq 0.001$) chez les rats traités par l'extrait de la plante administré à T0 et à T5 comparé aux rats DMH.

D'autre part, le bilan lipidique (Figure 28-C) montre une diminution significative ($p \leq 0.001$) du taux de cholestérol total chez les rats DMH en comparaison avec les rats témoins. Ces résultats ne concorde pas à ceux obtenu par **Venkareshwarlu E *et al.*, (2014)** qui montrent une augmentation des taux de cholestérol total chez les rats DMH. Cette hypocholestérolémie peut être due à une insuffisance hépatique ou au développement du CCR. Par contre, les rats traités par la plante présente des taux proche de la normale qui se traduit par une nette amélioration relative à l'utilisation de la plante.

En outre, l'analyse des triglycérides montrent une augmentation significative ($p \leq 0.001$) chez les rats DMH par apport aux rats témoins

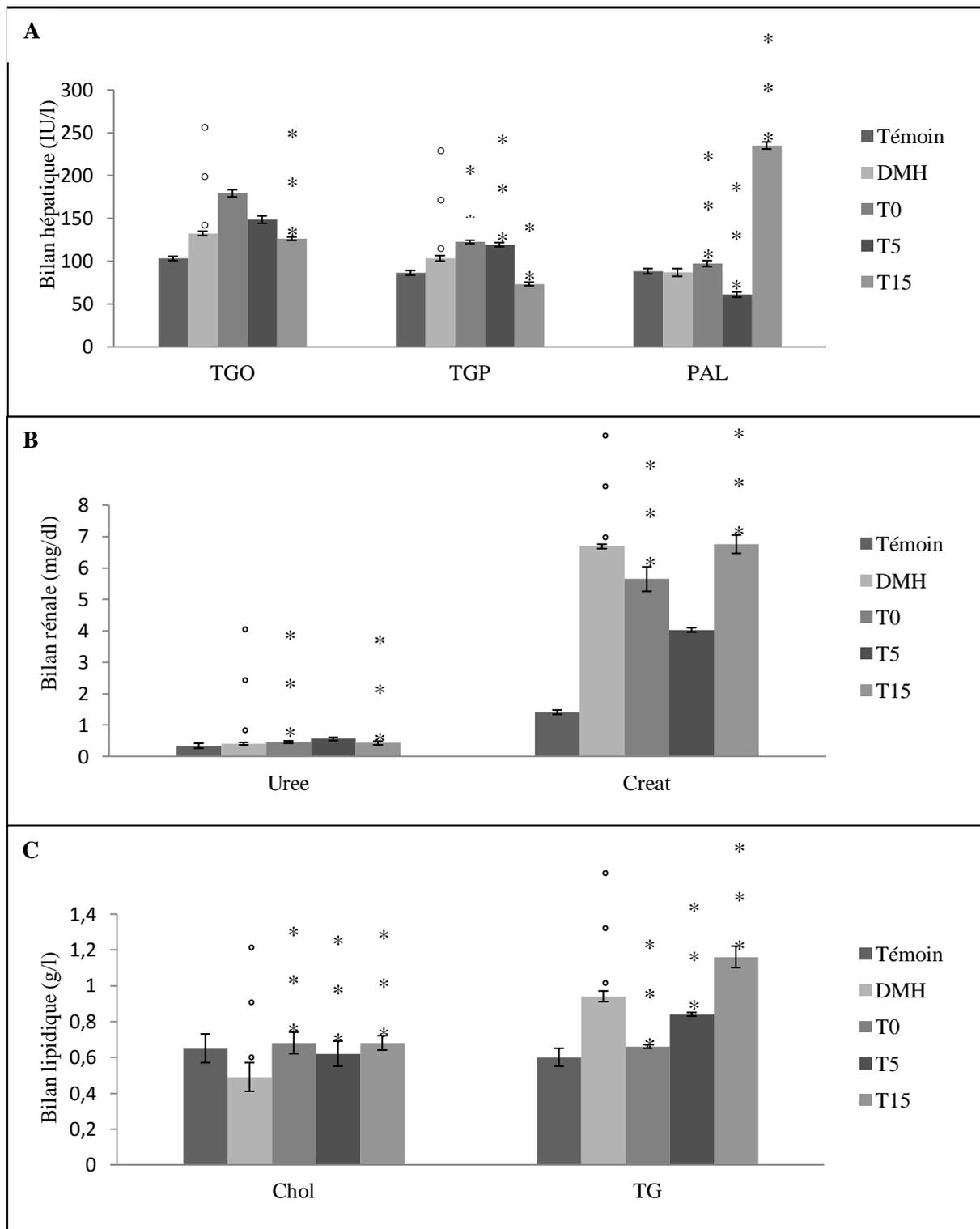


Figure N 28: Evaluation des paramètres biochimiques dans l'étude du traitement préventif **A)** Bilan hépatique, **B)** Bilan rénal, **C)** Bilan lipidique. $^{\circ} \leq 0.05$, $^{\circ\circ} \leq 0.01$, $^{\circ\circ\circ} \leq 0.001$ comparé au groupe témoin et $^* \leq 0.05$, $^{**} \leq 0.01$, $^{***} \leq 0.001$ comparé au témoin positif (DMH).

4.1.4. Paramètres hématologiques suite au traitement préventif :

Le système hématopoïétique est une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et de l'animal (Mukinda & Syce, 2007). Effectivement, l'utilisation du DMH pour induire le cancer ainsi que le traitement par la plante à différents moments ont produit des changements significatifs sur le taux des paramètres hématologique (Figure 29).

Selon l'analyse hématologique, Une augmentation significative du taux de globule blanc a été observée chez les rats DMH comparé aux rats témoins. Cette élévation du taux de globule blanc a été observée dans plusieurs études à l'essor d'utilisation du DMH (Venkateswarlu E. *et al.*, (2014); Kudatarkar NM et Nayak YK, (2018). Ces résultats impliquent la présence d'une inflammation chez les rats DMH. Ce taux a été plus marqué par une élévation significativement des granulocytes ($P \leq 0.01$). Des résultats similaire ont été observé chez Kawatra S. *et al.*, (2015) qui ont rapporté dans leurs étude sur l'effet protecteur de *Lantana camara L.* dans le CCR induit par de DMH où les rats du groupe DMH (20mg/kg) ont montré un pourcentage plus élevé de granulocyte neutrophiles par rapport aux nombre de lymphocyte, Ce qui était due probablement à une réponse immunitaire plus faible ou à une inflammation causée par le DMH dans le côlon (Barthod SW *et al.*, 1977). Des études antérieures *in vitro*, ont montré une suppression de l'activité cytotoxique des cellules immunitaires due à un nombre élevé de neutrophiles. Des résultats identiques sont obtenus chez l'homme avec un effet immunosuppresseur sur l'immunité de l'hôte en raison d'un nombre élevé de neutrophiles, ce qui entraîne de mauvais pronostic cliniques (Luis FP *et al.*, 2010).

D'autre part, l'administration de l'extrait de la plante a montré un effet protecteur par une diminution significativement ($P \leq 0.001$) du taux des globules blancs. De ce fait, une atténuation de l'inflammation a été remarquée ce qui est relativement due aux polyphénols et flavonoïde présents dans l'extrait de la plante.

L'action du DMH a démontrée un nombre de globule rouge significativement élevé ($P \leq 0.001$) chez les rats DMH par apport aux groupes témoin, ces résultats concordent avec ceux obtenus par Thiyagarajan D. *et al.*, (2006); Venkateswarlu E. *et al.*, (2014) et Kawatra S. *et al.*, (2015). Cependant, les groupes traités par la plante présentée des taux proches de la normale.

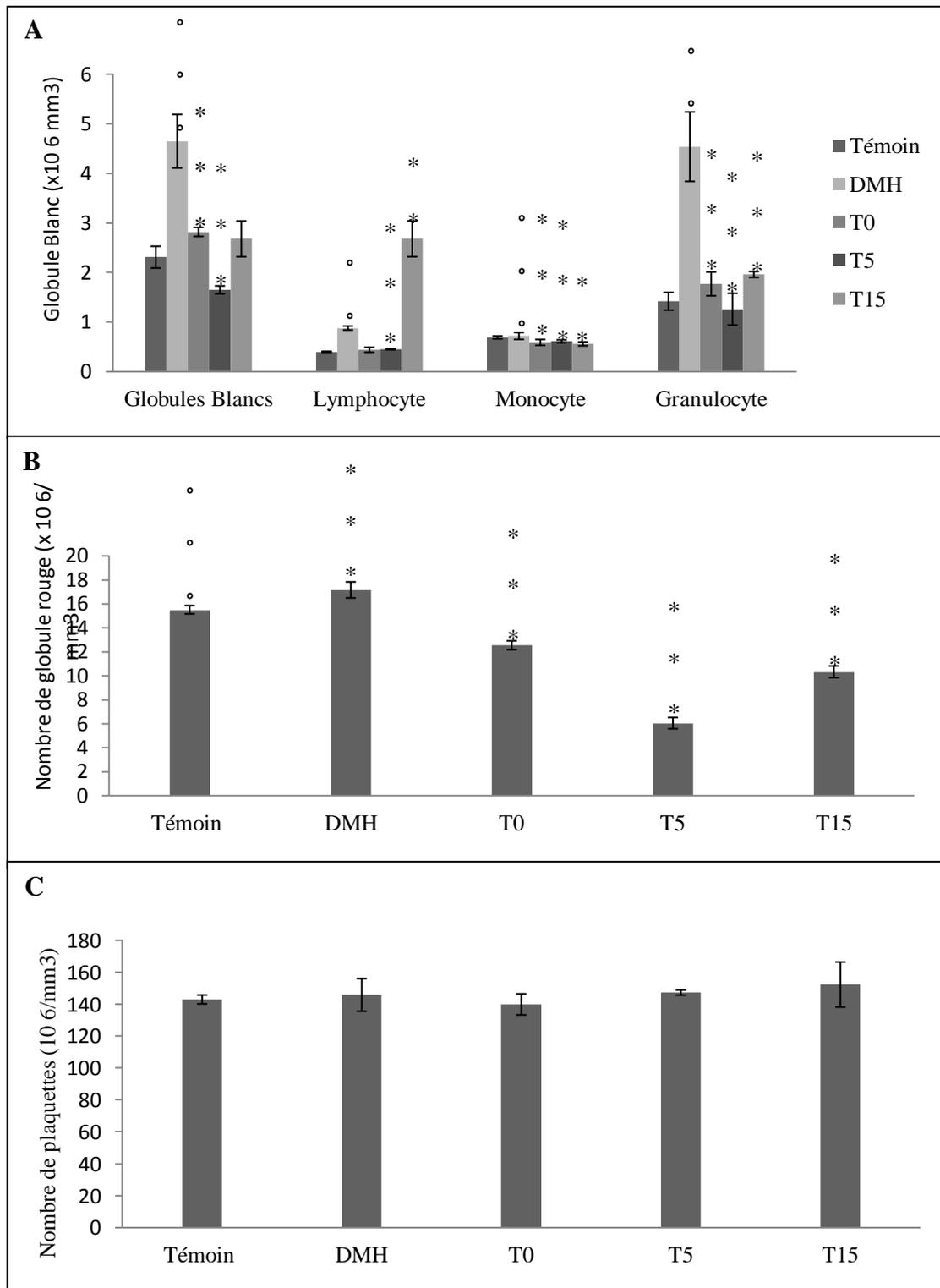


Figure N° 29: Evaluation des paramètres hématologique dans l'étude du traitement préventif. **A)** Nombre de globules blancs, **B)** Nombre de globule rouge, **C)** Nombre de plaquettes sanguines. °≤0.05, °° ≤0.01, °°°≤0.001 comparé au groupe témoin et *≤0.05, ** ≤0.01, ***≤0.001 comparé au témoin positif (DMH).

D'autre par, le nombre de plaquettes montre une légère augmentation mais qui reste non significative chez les rats DMH comparé aux rats témoins. ces résultats concordent avec ceux de **Kawatra S. et al., (2015)** par contre les résultats obtenus par **Venkateshwarlu E. et al., (2014)** montrent une diminution des plaquettes due à l'effet du DMH.

4.1.5. Dosage des marqueurs tumoraux suite au traitement préventif :

Les marqueurs tumoraux sont des substances soit libérées par les cellules cancéreuses dans le sang ou l'urine, soit créées par l'organisme en réponse aux cellules cancéreuses. (**Kawatra S. et al., 2015**). La figure N°30: présente le taux des marqueurs tumoraux ACE et CA19.9 suite au traitement préventif par l'*Atriplex halimus*.

L'ACE est l'un des marqueurs tumoraux les plus utilisés et certainement le marqueur le plus fréquemment recherché dans le cancer colorectal (**Duffy MJ., 2001**). L'ACE humain et l'ACE de rat sont similaires non seulement dans leurs propriétés physicochimiques et sérologiques, mais aussi dans leur distribution tissulaire (**Shetye JD. et al., 1990**). Depuis, très peu d'études ont été publiées concernant le taux d'ACE et la carcinogenèse du côlon chez le rat, notamment en utilisant des systèmes de modèles *in vivo*, Dans la présente étude une augmentation significative du taux d'ACE a été observée chez les rats DMH comparé au témoin. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par (**Kawatra S. et al., 2015**). Cette augmentation na pas été corriger a travers l'utilisation de l'extrait de plante à T5 et à T15 car une nette augmentation significative ($P \leq 0.001$) a été observée. Par contre, chez le groupe ou l'extrait a été administré au même temps que le DMH, Un taux normal d'ACE est observé.

L'antigène Carbohydrate (CA) 19-9, est le deuxième marqueur tumoral gastro-intestinal le plus étudié, est connu pour être un antigène Lewis-a sialylaté (**Magnani, J.L. et al., 1982**). Il est moins sensible que l'ACE pour le CCR (**Duffy, M.J., 1998**). Nos résultats montent une augmentation significative ($P \leq 0.001$) du taux de CA 19.9 chez les rats DMH. Les rats traités par l'extrait de plante à T0 et à T15 présentent une diminution significative ($P \leq 0.001$) proche de la normal par rapport au groupe DMH. Par contre, le groupe traité par l'extrait de plante à T5 présente une augmentation très significative ($P \leq 0.001$) du taux CA19.9 par rapport aux rats témoins et aux rats DMH.

En conclusion, les taux des deux marqueurs traduisent le taux de développement des cellules cancéreuses dans l'organisme des rats. La diminution de leurs taux est relative un effet protecteurs et préventif due à l'utilisation de l'extrait de la plante.

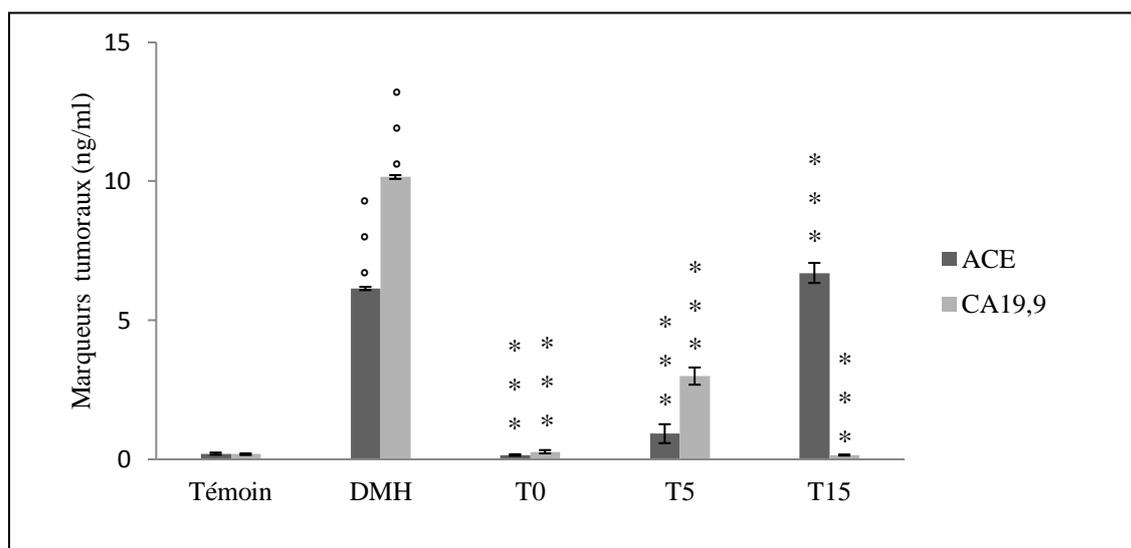


Figure N°30 : Taux des marqueurs tumoraux ACE et CA19.9 dans l'évaluation du traitement préventif. $^{\circ}\leq 0.05$, $^{\circ\circ}\leq 0.01$, $^{\circ\circ\circ}\leq 0.001$ comparé au groupe témoin et $^{*}\leq 0.05$, $^{**}\leq 0.01$, $^{***}\leq 0.001$ comparé au témoin positif (DMH).

4.1.6. Evaluation du nombre AFC suite au traitement préventif :

Les ACF ont été quantifiés selon le protocole établi par **McLellan (1988)**. Selon **Mori H. et al. (2004, 2005)**, Le développement de l'adénome au carcinome est caractérisé par l'apparition des cryptes aberrantes dysplasiques. Ainsi **Femia et Caderni, (2008)** ont démontré que le processus de cancérogénèse débute de 8 à 12 semaines après l'induction par la formation de foyers de cryptes aberrantes. De ce fait, afin d'évaluer l'efficacité des traitements préventif a base d'extrait de la plante nous avons procédé au comptage du nombre AFC par colon et le nombre des cryptes par ACF. L'observation au microscope optique des colons colorés au bleu de méthylène est effectuée en aveugle (colon codés). Les ACF ont été classés en trois catégories : petits (1-3 cryptes/foyer), moyens (4-6 cryptes/foyer) et large (7 cryptes/foyer). Les résultats sont rapportés sur la figure N°31 et le tableau N°16:

Nos résultats révèlent, que l'incidence des lésions précancéreuses présente des pourcentages qui varient de 87 à 100 % chez les groupes DMH par rapport aux groupes traités par l'extrait de la plante. De plus l'administration de l'extrait de la plante a atténué cette fréquence (DMH, T5 et T15: 100 % vs T0: 87%) (Tableau N°16).

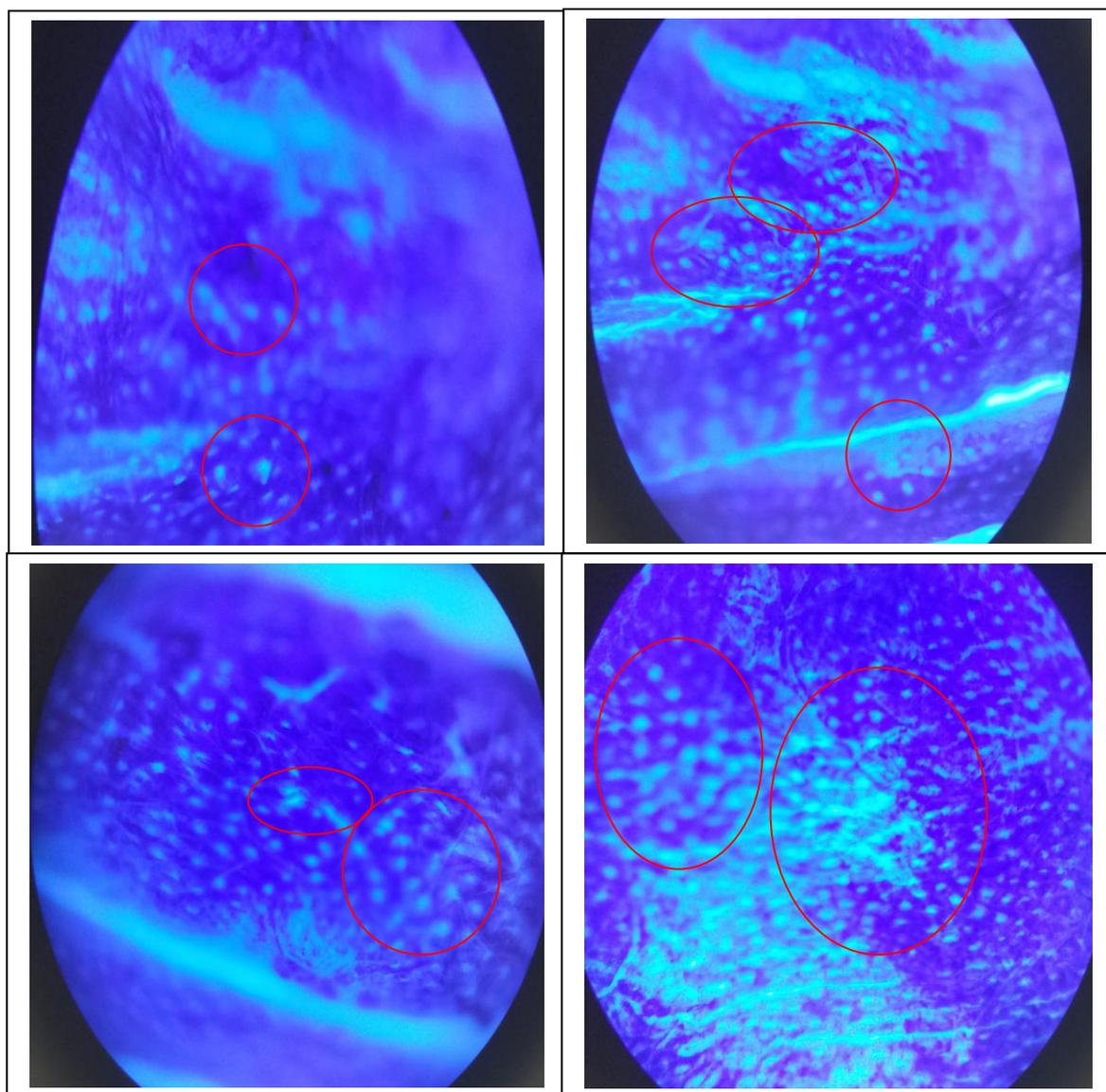


Figure N°31 : Observation microscopique des foyers de cryptes aberrantes dans colons des rats DMH colorés au bleu de méthylène (X40)

Tableau N°16: Nombre des foyers des cryptes aberrantes lors de l'évaluation de l'activité préventif des extraits de l'*Atriplex h.*

Groupe	Indice	Total AC	Petite	Moyenne	Large
Témoin	0/8 (0%)	0	0	0	0
DMH	8/8 (100%)	287±18.39	64±10.54	53±8.9	27±14.5
T0	7/8 (87%)	139±15.87***	42±17.2***	39±11.26***	10±15.3***
T5	8/8 (100%)	205±10.34**	55±17.24***	51±14.12***	15±12.9***
T15	8/8 (100%)	261±12.87*	52±15.26***	49±15.9*	22±10.98***

Les valeurs sont exprimé en moyen±S.D, n=8 par groupe * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparé au groupe témoin positif (rats DMH)

Suivant les résultats obtenus du comptage d'AFC nous avons constaté la présence d'un nombre important d'AFC chez le groupe de rats DMH et leurs absences dans le groupe témoin négatif. Alors que les groupes traités par l'extrait de la plante ont présenté des diminutions significatives ($P \leq 0.001$) comparé au groupe DMH et ceci par rapport au nombre des AFC petit, moyen et large. Le groupe T0 ou l'extrait de la plante a été administré au même temps que le DMH a présenté la valeur AFC la plus faible ce qui prouve que la combinaison de l'extrait avec l'agent inducteur (DMH) a inhibé et diminué son effet cancérogène et joué un rôle protecteur. Cet effet d'atténuation sur la formation d'ACF est soutenu par plusieurs études qui ont prouvé que l'ingestion diététique des antioxydants diminue de manière significative la formation d'ACF (**Ashokkumar et Sudhandiran, 2008 ; Sengottuvelan *et al.*, 2006**).

Effectivement, Les ACF sont les premières lésions rencontrées dans côlons des rongeurs traités par des carcinogènes ainsi que chez les humains présentant un risque élevé de développement d'un cancer du côlon et chez les patients atteints d'un cancer du côlon (**Pretlow TP *et al.*, 1991; Zhu RM et Zhang YS., 1997**). Plusieurs études portant sur les caractéristiques génotypiques, morphologiques et de croissance des ACF ont soutenu l'affirmation selon laquelle les ACF sont des lésions préneoplasiques (**Bird RP., 1995**). Le système ACF est fréquemment utilisé pour identifier et étudier la modulation de la carcinogenèse du côlon. A cet égard, le résultat obtenu à travers l'utilisation du traitement préventif par l'extrait de la plante montre une modulation dans le nombre d'AFC relativement due aux composés présents dans l'extrait de la plante. Mais son utilisation à T0 présente les meilleurs résultats qui suggèrent l'inhibition de l'effet promoteur par les polyphénols présents dans l'extrait lors de l'induction par le DMH.

4.2. Evaluation du traitement curatif :

L'évaluation de l'activité anticancéreuse de l'*Atriplex halimus* a été réalisée après 30 semaines de l'induction dès que l'adénocarcinome colorectal c'est installé, différents traitements ont été réalisés (Figure 32) : Traitement avec la plante, traitement combinant la plante à la chimiothérapie puis un traitement avec la chimiothérapie seul. Ces traitements ont été comparés aux témoins positifs (Rats DMH) et témoins négatifs. Aussi, des études antérieures ont indiqué qu'une période plus longue de traitement au DMH conduit au développement d'un carcinome du côlon (**Cheng et al., 2003**). Dans cette étude le traitement chimio-thérapeutique Xélox a été utilisé pour la première fois dans CCR induit par le DMH pour comparer avec le traitement par la plante. Dans des études antérieures la chimiothérapie 5-fluorouracil est toujours utilisée dont l'étude de **Hanaa H. A. et al., (2013)** dans sa recherche d'effet anti-tumoral d'extrait de *BOSWELLIA SERRATA*, ainsi que l'étude de **Venkateshwarlu E. et al., (2014)** par l'évaluation d'activité anticancéreuse d'*Annona muricata* dans le cancer colorectal induit chez les rats par le 1, 2-Diméthylhydrazine

4.2.1. L'évolution du poids corporel des rats suite au traitement curatif :

Les premiers changements observés dans cette étude sont les modifications du poids corporel des rats qui reflètent relativement leurs états physiopathologiques. Effectivement, comme déjà discuté dans la partie sur l'effet du DMH dans l'évaluation du traitement préventif. Les changements dans le poids corporel est un indicateur des effets d'un composé chimique (**Hilaly et al., 2004**) et (**Mukinda & Syce, (2007)**). Trois phases de la cancérogenèse ont pu être déterminées (phase d'initiation, de promotion et de progression). Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure N°32-A:

Dans la première phase d'initiation, une diminution significative ($P < 0.05$) du poids corporel des rats DMH par rapport au groupe témoin a été observée pendant la période d'induction de cinq semaines relativement due à l'induction par le DMH.

La deuxième phase de promotion a été marquée par une légère augmentation du poids corporel des rats DMH, proportionnellement due à la fin de l'injection de DMH, mais leur poids corporel reste nettement supérieur à celui du groupe de Témoin.

La troisième phase de progression commence à la 15^{ème} semaine, qui a été marquée par une diminution du poids corporel due au processus de changement physiopathologique

des carcinogènes, mais leur poids reste significativement plus élevé ($P < 0.05$) que celui des rats du groupe de témoin.

La dernière phase comprenait la période de traitement qui commençait à la 30^e semaine après la mise en place du processus tumoral et qui consistait en trois traitements comme suit (Chimiothérapie, combinaison entre la chimiothérapie et l'extrait de la plante et traitement par l'extrait de la plantes). Les traitements ont été divisés selon le protocole de chimiothérapie en trois périodes consécutives réalisées en trois mois (trois semaines de traitement alternées avec une semaine de repos) ; les résultats obtenus après le début du traitement ont montré une nette diminution ($P < 0,001$) du poids des rats ayant reçu les différents traitements par rapport au groupe de rats DMH et de rats témoins.

En outre, après la troisième semaine, une récupération importante du poids corporel a été observée pendant la semaine de repos sans traitement, qui est restée toujours inférieure à aux poids des rats témoins. Ces résultats concorde avec le séquençage de développement de adénocarcinome colorectal établi par (**Femia A. M. et Caderni G., 2008; Bird R. P., 1998**).

4.2.2. Aspect et poids relative des organes suite au traitement curatif:

Le changement du poids des organes internes est un indice de toxicité après l'exposition à une substance toxique (**Raza et al., 2002; Teo et al., 2002**).

L'autopsie des organes des rats DMH a montré un aspect différent de celui des organes du groupe témoin en particulier dans les foies et les poumons (Annexe 06). En outre, une augmentation significative ($p < 0,001$) du poids relatif du poumon ainsi qu'une atrophie lobulaire avec présence de nodule et une coloration rouge accentuée ont été observées. D'autre part, le foie ne présentait pas de différence significative du poids relatif par rapport au foie des rats témoins, mais il présentait un aspect bombé par endroit avec une coloration plus sombre dans le groupe de rats DMH.

Pour les autres organes, une diminution significative ($p < 0,05$) du poids relatif du cœur a été observée dans le groupe de rats DMH par rapport aux groupe témoin. La rate a montré une augmentation significative du poids relatif ($p < 0,05$). Ainsi les reins ont également été modifiés avec un aspect bosselé, une coloration plus sombre et une hypertrophie qui ce traduits par une augmentation significative du poids relatif ($p < 0,001$).

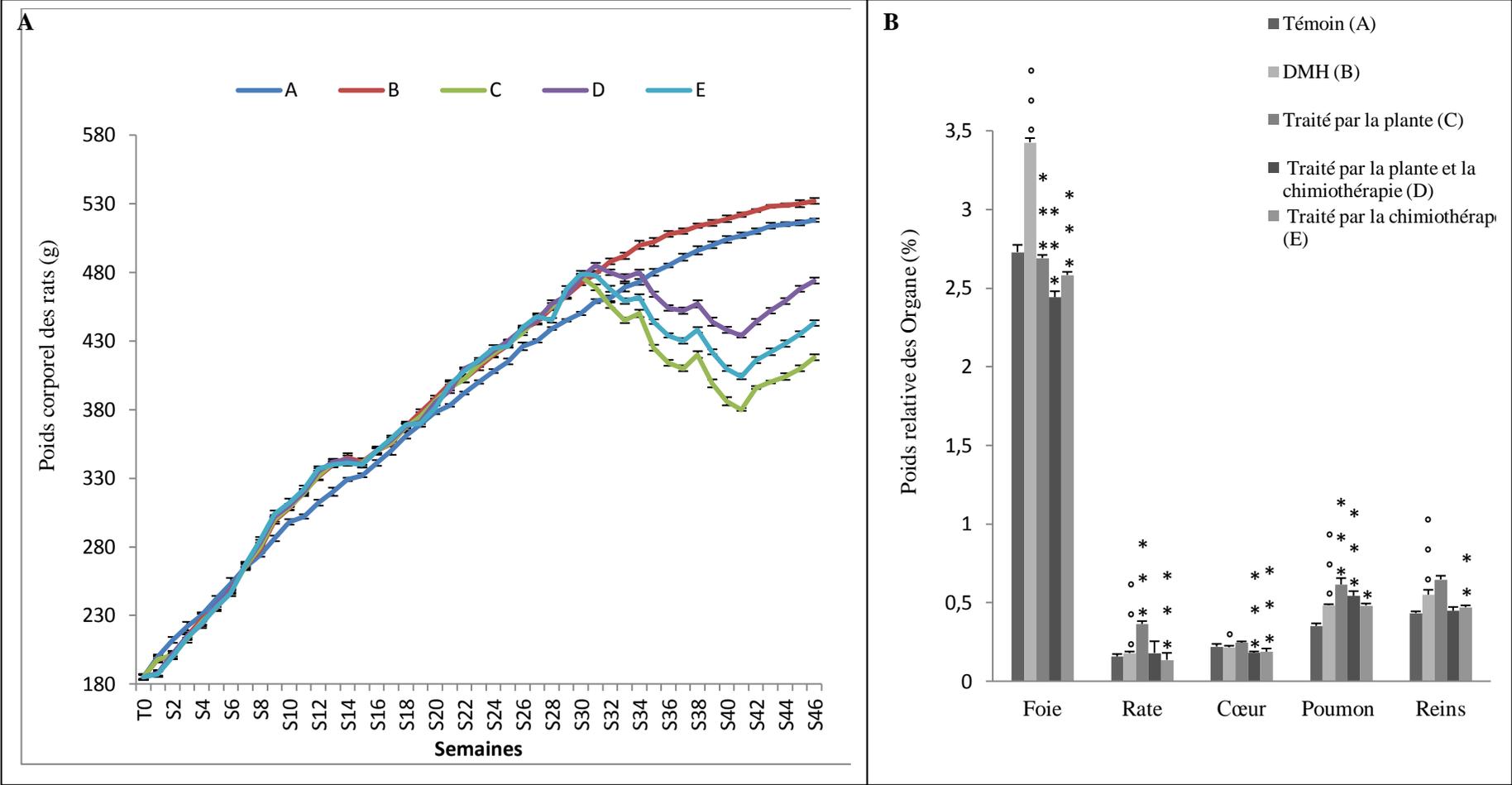


Figure N°32: Evaluation du traitement curatif. **A)** Evolution du poids corporel des rats, **B)** le poids relatif des organes. $\circ \leq 0.05, \circ \circ \leq 0.01, \circ \circ \circ \leq 0.001$ comparé au groupe témoin et $* \leq 0.05, ** \leq 0.01, *** \leq 0.001$ comparé au témoin positif (DMH).

4.2.3. Paramètres biochimiques suite au traitement curatif:

L'étude préclinique de l'activité anticancéreuse par induction du cancer colorectal et de ces différents traitements s'est intéressée à l'évaluation de trois bilans différents (rénal, hépatique et lipidique) ; les résultats observés ont été résumés dans la Figure N°33.

Le bilan hépatique (Figure 33-A) a montré une augmentation marquée ($P < 0,001$) des enzymes TGP et TGO chez les rats DMH par rapport aux rats du groupe témoin. Effectivement, il est bien connu que les métabolites du DMH causent des dommages hépatiques (**Sengottuvelan M, Nalini N., 2006**). En outre, les groupes (C, D et E) respectivement ont présenté une diminution significative ($P < 0,001$) qui est due à l'utilisation des différents traitements. Par conséquent, une diminution significative du PAL a également été marquée dans le groupe DMH qui n'a pas été améliorée par les traitements.

Entre autres, La fonction rénale a été caractérisée par trois paramètres biochimiques : l'urée, la créatinine et la protéine totale (Figure 33-B), avec les résultats suivants : une augmentation significative de l'urémie a été observée chez les rats DMH ($P < 0,001$), mais les groupes de rats ayant reçu différents traitements ont présenté une déplétion significative par rapport aux rats DMH ($P < 0,05$). De plus, le taux de créatinémie et le niveau de protéines totales ont montré une augmentation significative chez le groupe DMH comparé aux groupes témoin. Les autres groupes ont présenté une nette amélioration après l'utilisation des différents traitements ($P < 0,001$).

L'évaluation des paramètres lipidiques (Figure 33-C) a montré une modification des niveaux de cholestérol et de triglycérides. Le taux de cholestérol a été réduit de manière significative chez les rats DMH ($P < 0,05$) et est resté plus élevé chez les rats ayant reçu différents traitements, à l'exception du groupe (E) qui a montré une diminution significative ($p < 0,001$). Quant au niveau de triglycérides, il n'a pas montré de changement significatif chez les rats DMH par rapport aux rats du groupe témoin.

Selon **Koukourakis MI. Et al., (2011)** de nombreux cancers peuvent augmenter le taux de cholestérol, il n'est donc pas utile pour identifier un type de cancer spécifique. Cependant, la mesure des taux de LDH peut être utile pour surveiller le traitement du cancer, des taux élevés de LDH sont corrélés à un pronostic plus défavorable chez les patients atteints de cancer colorectal.

L'analyse des paramètres biochimiques révèle que le résultat du traitement par la l'extrait de la plante combiné à la chimiothérapie été le plus intéressant avec les taux les plus proches de ceux des rats témoins, préservant ainsi au mieux les différentes fonctions vitales.

En conclusion, les altérations des fonctions rénales et hépatiques ont été mises en évidence par l'analyse biochimique et l'aspect macroscopique des organes en raison de la toxicité de la DMH. Le traitement par chimiothérapie a permis la régression de la tumeur. Mais, les effets néfastes de ces molécules ont affecté les fonctions physiologiques. Contrairement à cela, le traitement chimiothérapique complété par l'extrait de plante, semble montrer les meilleurs résultats apportant un effet curatif sur le cancer et protecteur des fonctions vitales en réduisant les effets indésirables de la chimiothérapie.

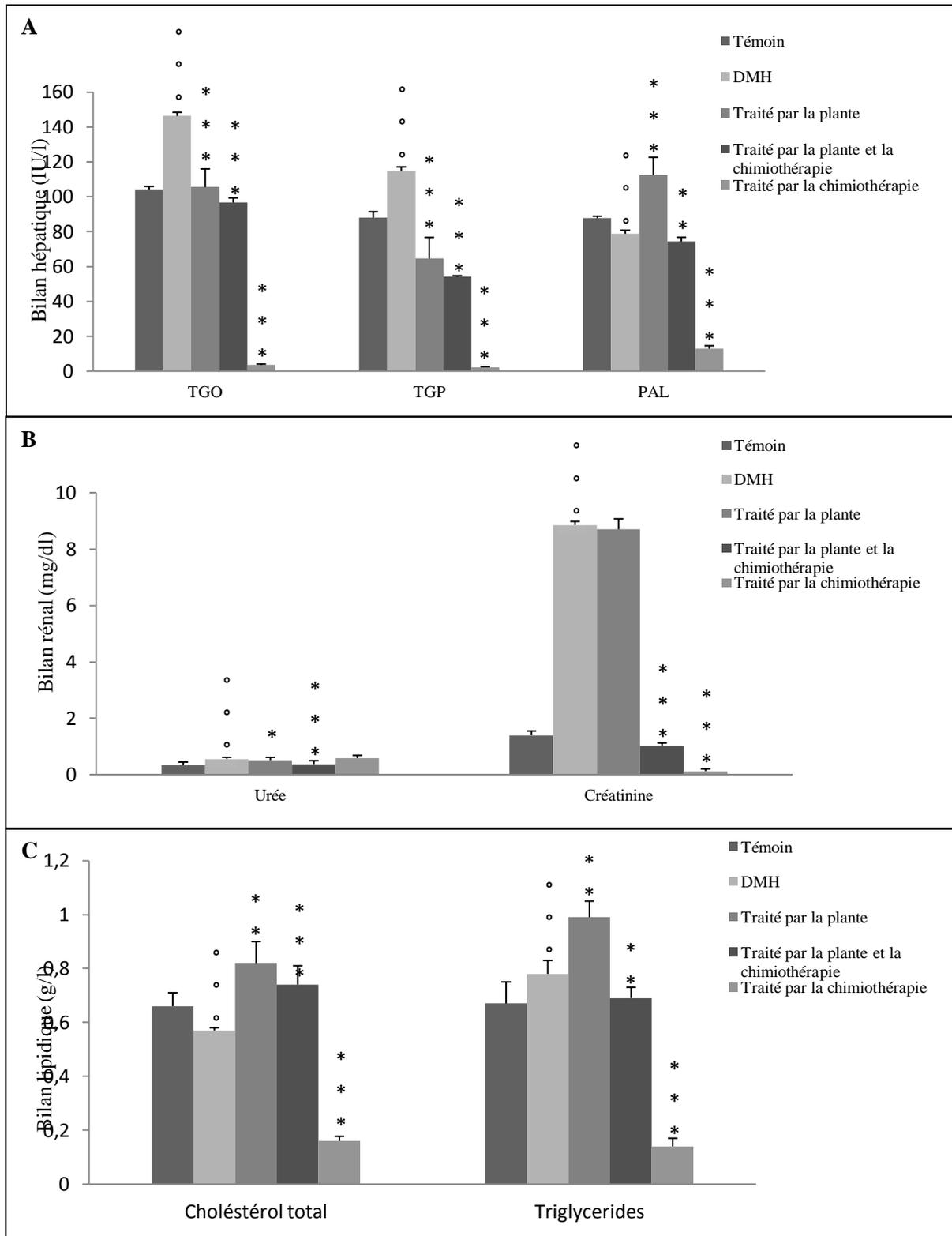


Figure N°33: Evaluation des paramètres biochimiques dans l'étude du traitement curatif. **A)** Bilan hépatique, **B)** Bilan rénal, **C)** Bilan lipidique. $^{\circ} \leq 0.05$, $^{\circ\circ} \leq 0.01$, $^{\circ\circ\circ} \leq 0.001$ comparé au groupe témoin et $^* \leq 0.05$, $^{**} \leq 0.01$, $^{***} \leq 0.001$ comparé au témoin positif (DMH).

4.2.4. Paramètre hématologique suite au traitement curatif :

L'analyse des paramètres hématologique illustré dans la (Figure 34) a permis de recherché les différences entre le groupe témoin (A) et groupe DMH (B) afin de déceler l'impact pathologique sur les paramètres sanguin pour permettre par la suite d'apprécie l'amélioration de ces dernier a travers l'utilisation des différents traitements (C : groupe traité par l'extrait de la plante ; D : groupe traité par plante et chimiothérapie ; E ; groupe traité par chimiothérapie)

L'interprétation de l'hémogramme n'a montré aucun changement significatif du nombre de globules rouges, à l'exception d'une légère diminution qui été observée chez le groupe (C) ($p < 0,05$) comparé au groupe témoin.

Le niveau d'hématocrite a montré une diminution significative ($p < 0,05$) chez les rats DMH et les rats du groupe (C) par rapport aux rats témoins. Alors qu'une augmentation significative a été observée dans le groupe (D) par rapport aux rats DMH ($p < 0,001$). Aucun changement n'a été noté dans le groupe (E) mais il reste proche à la normale. Ces résultats nous montrent un état anémique masqué par une hémococoncentration chez le groupe de rats DMH qui n'a pas été modifié dans les groupes (C, E), alors que le groupe (D) n'a pas montré d'anémie mais une très légère hémodilution.

Le niveau d'hémoglobine a été significativement diminué dans les groupes de rats (B, C et D) par rapport aux rats témoins ($p < 0,001$). Alors qu'une augmentation significative a été observée chez les rats du groupe C ($p < 0,05$). Elle peut s'expliquer par l'hémococoncentration. Selon le niveau d'hémoglobine et le volume cellulaire moyen, une diminution significative chez les rats DMH a été observée par rapport aux rats du groupe témoin ($p < 0,05$), qui n'a pas été modifiée dans les groupes de rats (C et E). C'est le signe d'une anémie microcytaire, alors que les rats du groupe (D) ont montré un taux significativement élevé dû à l'hémodilution inversant l'état d'anémie ($p < 0,001$) qui est preuve d'une nette amélioration (Figure 34-B)

En outre, une augmentation significative de leucocytes a été observée dans le groupe de rats DMH ($p < 0,001$), leur nombre augmentant de manière significative selon les différents groupes traités (C, D et E) respectivement, ce qui renvoie à une hyperleucocytose due un profil inflammatoire ($p < 0,001$). (Figure 34-A)

De plus, une augmentation significative du nombre de plaquettes a été observée chez les rats du groupe (DMH, C et D) par rapport au témoin, indiquant une thrombocytose importante ($P < 0,001$) (Figure 34-C).

En conclusion, Les résultats de l'hémogramme ont révélé une anémie chez les rats DMH qui se traduit généralement par une perte de sang occulte dans le cas du cancer colorectal en l'absence d'un état hémorragique avec hyper leucocytose due au processus inflammatoire du cancer, ces résultats sont relativement en accord avec ceux de l'étude sur l'activité anticancéreuse d'*Annona murtica* (**Venkateshwarlu E, 2014**). Entre autres, le nombre de plaquettes était significativement élevé ($P < 0,001$) chez les rats cancéreux, ce qui est similaire aux résultats des études sur l'induction du cancer colorectal par la DMH (**Kudatarkar NM, 2018**) ceci est relativement cohérent avec les travaux connus depuis longtemps du professeur **Trousseau A., (1865)**, qui démontre une relation étroite entre le nombre élevé de plaquettes et le cancer. Quelques années plus tard les travaux de **Billroth T., (1878)** mettent en évidence la présence de cellules cancéreuses dans les thrombus. Cependant, parmi les différents acteurs à l'interface du cancer primaire et de l'état métastatique, le rôle et le mécanisme que jouent les plaquettes dans le processus de cancérogenèse affectant le pronostic vital (**Gasic GJ. et al., 1968, Camerer E. et al., 2004**).

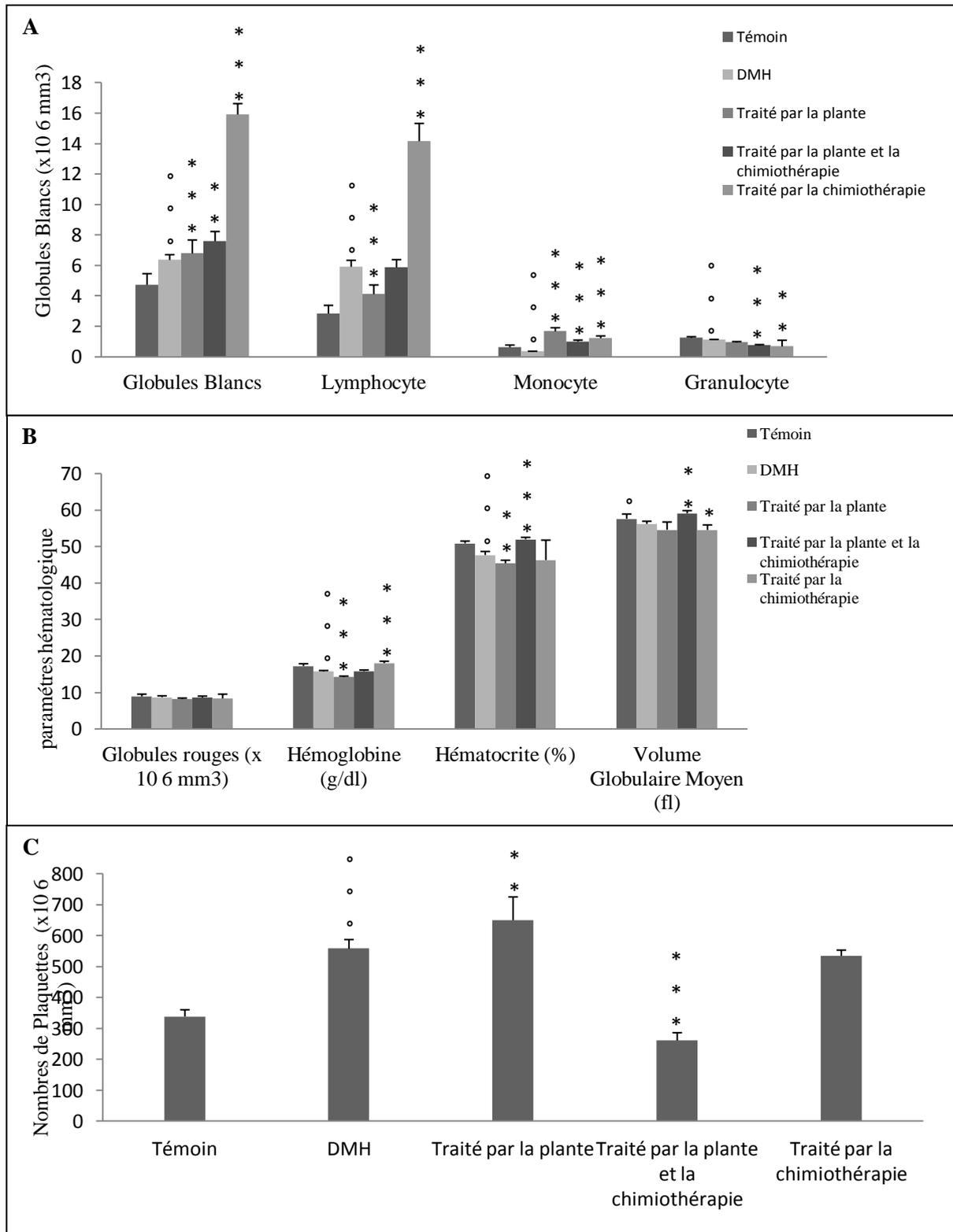


Figure N°34: Evaluation des paramètres hématologique dans l'étude du traitement curatif. **A)** Nombre de globules blancs, **B)** Paramétrées hématologique, **C)** Nombre de plaquettes sanguines. $^{\circ} \leq 0.05$, $^{\circ\circ} \leq 0.01$, $^{\circ\circ\circ} \leq 0.001$ comparé au groupe témoin et $^* \leq 0.05$, $^{**} \leq 0.01$, $^{***} \leq 0.001$ comparé au témoin positif (DMH).

4.2.5. Étude des marqueurs tumoraux suite au traitement curatif :

L'effet des différents traitements (C, D et E) sur les niveaux plasmatiques des marqueurs tumoraux du cancer colorectal ACE et CA19.9 est illustré dans le Figure N°35. Le groupe de rats DMH a présenté des niveaux significativement plus élevés des deux marqueurs tumoraux, d'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et d'antigène glucidique (CA19-9) par rapport aux rats sains. Effectivement, Les résultats ont montré une augmentation significative des taux sériques de ACE chez les rats DMH ($0,96 \pm 0,03$ ng/ml) par rapport au groupe de témoin avec ($0,11 \pm 0,01$ ng/ml) ($p < 0,001$). Cependant, par rapport à ces derniers, aucun changement significatif n'a été observé dans le groupe de rats traités par la plante ($0,82 \pm 0,005$ ng/ml). En revanche, les groupes traités par chimiothérapie ont montré une diminution significative avec ($0,15 \pm 0,03$ ng/ml) ($p < 0,001$). Alors que le traitement combinant plante et chimiothérapie présente le plus faible niveau de concentration en ACE dans le sérum des rats ($0,15 \pm 0,02$ ng/ml).

D'autre part, le niveau sérique d'antigène glucidique (CA19.9), est marqué par une élévation significative chez les rats DMH avec ($5,13 \pm 0,1$ ng/ml) ($p < 0,001$). Le traitement à base de la plante a montré une légère diminution non significative avec ($2,87 \pm 0,06$ ng/ml). Par contre, le traitement combinant les deux (D) a présenté une diminution significative avec ($0,08 \pm 0,1$ ng/ml). Ce qui n'était pas loin des résultats obtenus avec un traitement de chimiothérapie dans lequel le taux sérique de CA19.9 était de ($1,23 \pm 0,09$ ng/ml) ($p < 0,001$).

L'antigène glucidique (CA19-9) est une protéine présente à la surface de certaines cellules cancéreuses, notamment celles du côlon et du rectum ; leur taux élevé dans le sang indique le développement de métastases spontanées dans le foie et les poumons (**Thomas P. et al, 1995**). Dans notre cas, les différents traitements utilisés semblent potentiellement réduire les taux sériques d'ACE et de CA19-9 et, en se référant aux résultats de la recherche (**Abd El Monem M. et al, 2013**), leur diminution devrait être prise en considération. De ce fait, nos résultats reflètent conformément ceux obtenus par (**Abdel-Rahman M. et al 2013, Sorial A. et al, 2014**).

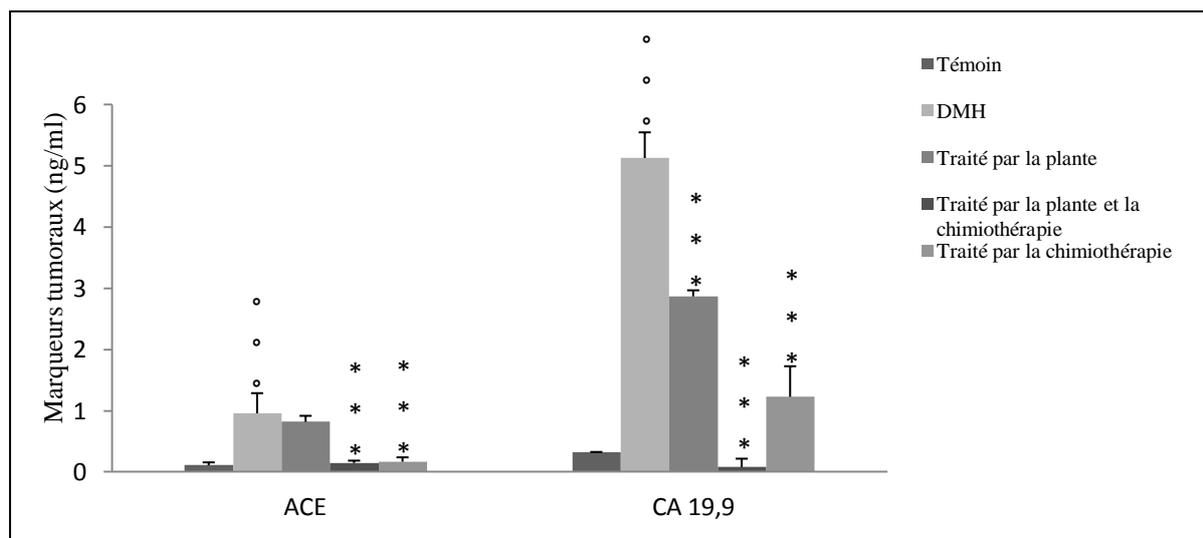


Figure N°35: Evaluation du taux des marqueurs tumoraux dans l'étude du traitement curatif. $^{\circ} \leq 0.05$, $^{\circ\circ} \leq 0.01$, $^{\circ\circ\circ} \leq 0.001$ comparé au groupe témoin et $^* \leq 0.05$, $^{**} \leq 0.01$, $^{***} \leq 0.001$ comparé au témoin positif (DMH).

4.2.6. Étude d'histologie suite au traitement curatif:

Les micrographies de la Figure N°36 montre l'aspect macroscopique et histologique des colons des rats issus de l'évaluation du traitement curatif. L'aspect macroscopique des différentes sections de tissu du côlon montre des changements pathologiques due à l'induction du cancer du côlon par le DMH en présentant la formation de polypes dans la lumière de l'intestin chez les rats cancéreux (B) par rapport aux rats témoins (A) ainsi que l'effet des différents traitements sur ces derniers (C, D et E).

L'aspect histologique des sections du côlon dans (Figure 36) montre des changements histopathologiques due au développement de l'adénocarcinome induit par le DMH ainsi que l'effet des différents traitements sur ce dernier incluant l'extrait d'*A. halimus*, la chimiothérapie ou la combinaison des deux traitements. La section histologique (b) du côlon DMH (H & E X40) présente une distorsion architecturale avec une prolifération de follicules lymphoïdes (double flèche) soulevant la muqueuse, une grande crypte anormale dilatée en forme de fente (flèche simple), nécrose, desquamation et des ulcères épithéliaux par localisation, une infiltration inflammatoire intense, une hyperplasie et une dysplasie des tissus, des cellules malignes infiltrées et avec des cellules hyperchromatiques. L'histologie des colons des rats traités avec la chimiothérapie et le traitement combiné présentaient une hyperplasie focale (double flèche) alors que le traitement par l'extrait de la plante présente un faible nombre d'infiltrats inflammatoires (H&E X40).

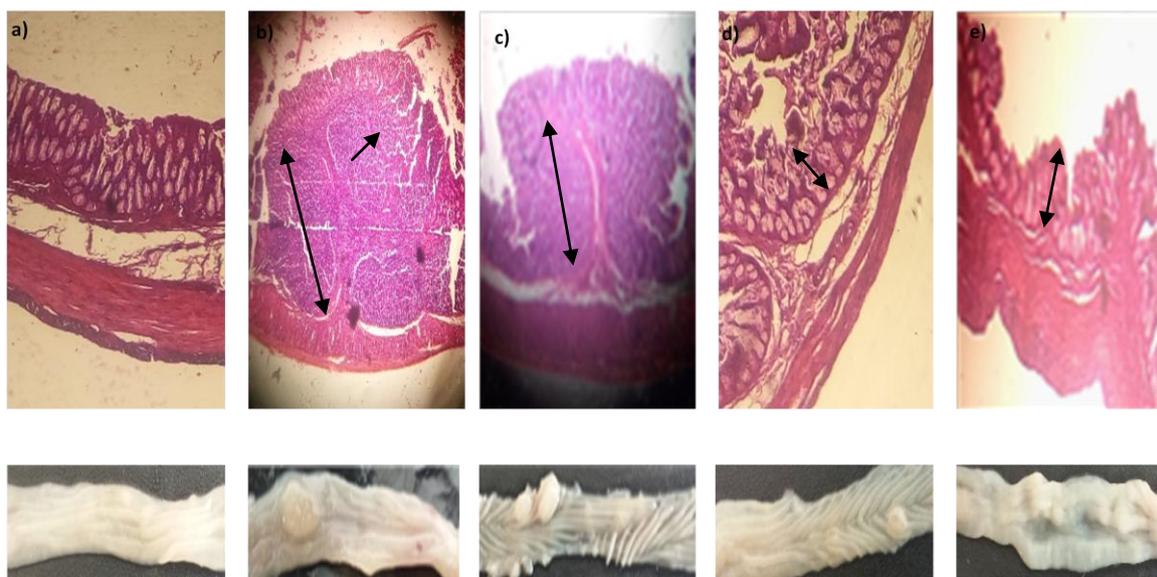


Figure N°36: Examen histologique des sections coliques des rats. A) Témoin, B) DMH, C) Traité par la plante, D) Traité par la plante et la chimiothérapie, E) Traité par la chimiothérapie.

La carcinogenèse du côlon par l'utilisation du DMH est un processus à plusieurs étapes avec caractéristiques morphologiques et histologiques similaires à celles observées dans la carcinogenèse du côlon sporadique humain (**Bird R. P., 1995; Tanaka T., 2009**). Il est nettement connue aujourd'hui que le passage de la séquence de l'adénome au carcinome est caractérisée par des changements histologiques reconnaissables qui commencent par l'apparition des cryptes aberrantes dysplasiques ou une néoplasie intraépithéliale (**H. Mori, et al., 2004, 2005**). Ces lésions ont par la suite le potentiel d'évoluer vers des adénomes avancés, qui ont un important potentiel de transformation en adénocarcinomes (**Tanaka T., 2009**).

Toute fois, les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels et peuvent empêcher l'activation du système immunitaire inné et adaptatif (**Hoensch & Oertel, 2015**). De ce fait, La diminution de l'inflammation dans échantillons histologique sont sans doute due à l'effet anti-inflammatoire des polyphénols et flavonoïde contenues dans des extrait de l'*Atriplex halimus*.

5. L'ÉVALUATION DU MICROBIOTE INTESTINAL

L'étude clinique de l'activité anticancéreuse de l'*Atriplex h.* ne serait pas complète sans l'évaluation de l'effet des différents traitements sur le microbiote intestinal.

Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique semble être de plus en plus évident (Davis CD. et Milner JA., 2009; Sobhani I. *et al.*, 2011). En conséquence l'hypothèse selon laquelle certains groupes bactériens du microbiote associés à une alimentation représentent un facteur de risque de CCR a été avancée (Scanlan PD. *et al.*, 2008; Huycke MM. et Gaskins HR., 2004; O'Keefe SJ. *et al.*, 2007). De cela le but de ce travail était de préciser l'association entre infection bactérienne et cancer colorectal et d'identifier ces souches.

L'identification des souches a été réalisée par l'analyse des caractères macroscopiques, microscopiques des colonies isolées ainsi que par des tests biochimiques. Certaines souches ont été confirmées par la méthode de spectrométrie de masse de type MALDI-TOFMS.

L'étude du microbiote intestinal montre des différences quantitatives et qualitatives des groupes bactériens sélectionnés. La Figure N°37 illustre les différents groupes bactériens isolés, En effet, par comparaison entre les différents groupes de rats. La flore aérobie et anaérobie totale montre une augmentation significative ($p < 0,001$) chez les rats cancéreux (6,3, 11,3 Log UFC/g) respectivement par rapport au groupe de témoin (5,12, 9,7 Log UFC/g) respectivement. Cependant, leur taux diminue de manière significative grâce à l'utilisation de différents traitements ($p < 0,05$) (Figure 37-A).

Parmi les bactéries anaérobies, le germe le plus isolé des colons des rats DMH est *Enterobacter cloacae* identifié par MALDI-TOF/MS (Figure 38).

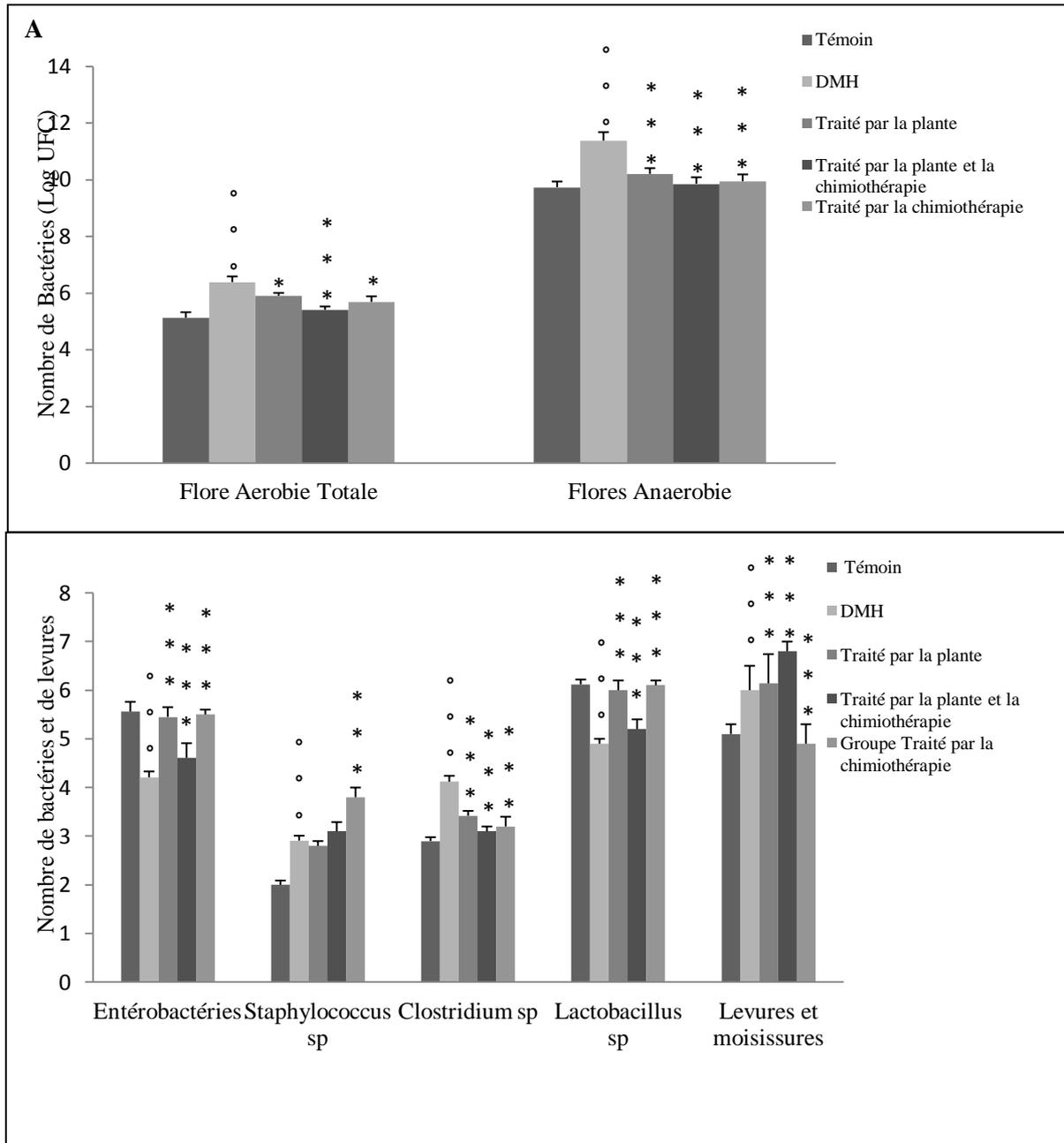


Figure N°37 : Evaluation du microbiote intestinale suite aux différents traitements de l'activité anticancéreuse.

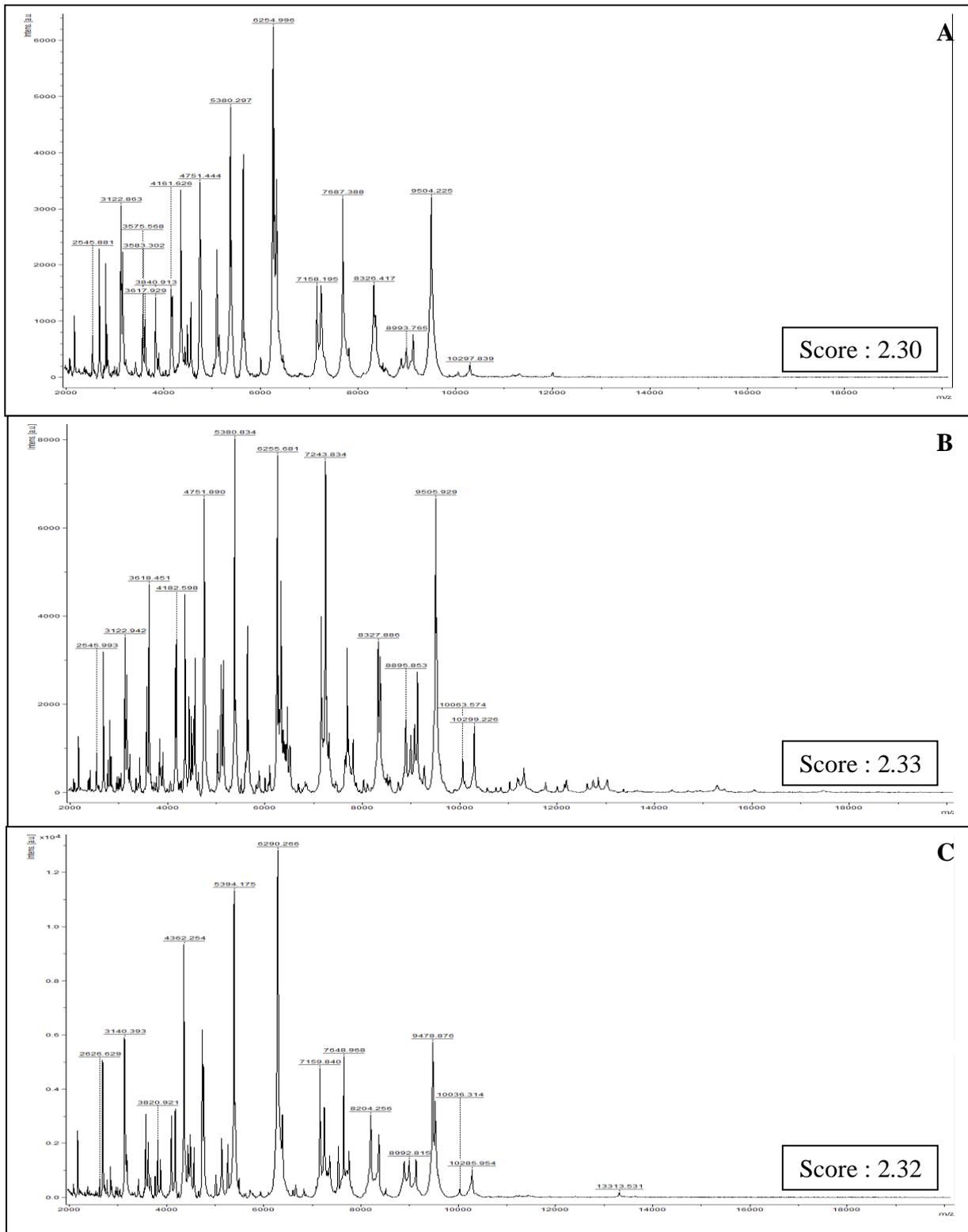


Figure N°38 : Chromatogrammes MALD-TOF-SM des souches *Enterobacter cloacae* isolé à partir des colons des rats induit par le DMH. **A)** Chez groupe DMH; **B)** Chez le groupe DMH+ chimiothérapie; **C)** Chez le groupe DMH+ traitement par la chimiothérapie et l'extrait de la plante.

De plus, le nombre d'entérobactéries diminue de manière significative chez les rats cancéreux (4,2 Log UFC/g) par rapport aux rats témoins (5,5 Log UFC/g) et augmente chez les différents groupes traités ($p < 0,001$). En revanche, les *Staphylocoques sp* étaient présents en faible nombre par rapport aux autres groupes bactériens avec un niveau de (2,9 Log UFC/g) chez les rats cancéreux et qui n'ont pas vu leur niveau modifié par les différents traitements (Figure 37-B).

En outre, la présence de *Clostridium sp* a augmenté de manière significative ($p < 0,001$) chez les rats cancéreux (4,1 Log UFC/g) par rapport au groupe témoin (2,9 Log UFC/g), par ailleurs, ce taux diminué de manière significative chez les rats traité par l'extrait de la plante ($p < 0,001$) (Figure 37-B).

Les *Lactobacillus sp* ont montré une diminution significative avec un taux de (4,9 Log UFC/g) dans le groupe DMH par rapport aux témoins (6,1 Log UFC/g) et ainsi une amélioration est été observé dans les groupes traités par l'*Atriplex h.* ($p < 0,001$).

D'autre part, les levures et moisissures isolées ont montré une augmentation significative chez les rats cancéreux avec un taux de (6 Log UFC/g) par rapport aux témoins (5 Log UFC/g) par contre, le traitement chimiothérapeutique a montré un taux de (4,9 Log UFC/g) (Figure 37-B).

Le colon chez l'homme est exposé en permanence à un mélange complexe de composés, qui sont d'origine alimentaire ou le résultat de processus de digestion microbiens. Certains de ces composés peuvent endommager la muqueuse intestinale et être à l'origine du cancer. On peut citer notamment les composés endogènes spécifiques du système digestif comme les acides biliaires ou des dérivés du métabolisme enzymatique comme les nitrosamines. Parallèlement, ce qui correspond à notre étude dans le cas du processus effectuer dans la métabolisation du DMH par les β -glucuronidase bactérienne qui permettent de libéré l'ion diazonium qui effectue l'effet cancérigène.

En effet, la flore intestinale joue un rôle important dans la promotion du cancer par la présence de certains germes pathogènes (**Gold JS et al, 2004**). **Kostic et Castellarin** démontrent que parmi les germes favorables à l'induction du cancer colorectal, les bactéries anaérobies telles que *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium perfringens*, et les anaérobies facultatifs tels que *Streptococcus bovis* et *Enterococcus*

faecalis. Conformément à nos résultats, la flore anaérobie totale chez les rats cancéreux était très élevée par rapport aux rats normaux.

Contrairement aux premier, les probiotiques ont la capacité d'influencer les mécanismes de protection de l'organisme et de réguler la fonction physiologique du tube digestif (Neish AS., 2009 et Sonnenberg GF, Artis D., 2012). Ainsi, les genres *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum* sont généralement les germes les plus liés à ces effets (McIntosh GH. *et al*, 1999 et Rowland IR., *et al*, 1996). Ces bactéries agissent comme des activateurs métaboliques qui ont la capacité de piéger des composés toxiques ou d'empêcher leur production in situ (Andrea Azcárate-Peril M *et al*, 2011) ou d'inhiber la tumorigenèse grâce à des propriétés antimutagènes qui empêchent la formation de lésions périnéoplasiques (Fani Gavresea *et al*, 2018). Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le nombre de *Lactobacilles sp* diminue de manière significative chez les rats cancéreux, alors que les traitements à base d'extraits de plantes présentent des taux plus favorables.

Récemment, l'étude réalisée par notre laboratoire rapporte l'effet antimicrobien de l'*Atriplex h*. Établi par (Hamdi A. et Tir Touil A., (2022)

Ozidal *et al.*, (2016); Catinean *et al.*, (2018) ; Talukder *et al*, (2019). Signalent dans leurs études que les polyphénols assurent une protection contre les troubles gastro-intestinaux et les agents pathogènes à travers plusieurs mécanismes: une augmentation de la sécrétion de mucus, la stimulation des cytokines et la modulation de la réponse immunitaire.

D'autres chercheurs ont suggéré que la prévention du cancer du côlon pourrait se faire par l'intervention de symbiotiques (prébiotique+probiotique) qui permettent certains changements substantiels dans le microbiote intestinal (Roberfroid M., 2007). Lors de la fermentation de ces prébiotiques par des microorganismes bénéfiques dans des conditions anaérobies, ils produisent des acides gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, l'acétate, le propionate en quantités variables. Ces derniers entraînent une diminution du pH et empêche ainsi la prolifération des bactéries pathogènes, qui sont sensibles au pH acide, Ces acides gras à courte chaîne agissent généralement comme une source de carbone pour les colonocytes et ils effectuent des activités métaboliques importantes comme la modulation des composants alimentaires bioactifs, la synthèse des vitamines par le microbiote intestinal. Leur

fonction façonne l'anatomie intestinale de l'hôte et le système immunitaire de la muqueuse intestinale (Wollowski I *et al.*, 2001; -Cherrington CA *et al.*, 1991). Parmi ces acides gras à chaîne courte, le butyrate joue un rôle défensif dans les dommages oxydatifs de l'ADN induits par H₂O₂. Il peut également diminuer la prolifération des cellules altérées et induire un processus de mort cellulaire programmée dans les cellules altérées (Rosignoli P, *et al.*, 2001; Hass R *et al.*, 1997). Des preuves ont montré que quatre micro-organismes probiotiques *Lactobacillus salivarius* (*L.salivarius*) FP25, *L. salivarius* FP35, *Pediococcus pentosaceus* FP3 et *Enterococcus faecium* FP51 présentaient des propriétés anti-prolifératives. Le mécanisme proposé a été attribué à l'induction synergique en adhérant directement aux cellules cancéreuses du côlon et en déclenchant la bioproduction d'acides gras à chaîne courte butyriques et propioniques (Thirabunyanon M. et Hongwittayakorn P., 2013).

D'autre part, Il a aussi été rapporté par de nombreuses études que les probiotiques jouent un rôle dans l'inhibition de la mutagénicité (Usman et Hosono, 1998). Les agents mutagènes se lient à la paroi cellulaire des probiotiques. En outre, des cellules entières de bactéries bifides ont également été trouvés lier avec des carcinogènes tels que le méthylazoxyméthanol (Kulkarni et Reddy, 1994) et le 3-amino-1,4-diméthyl-5H-pyrido[4,3-b] indole, favorisant de ce fait l'élimination physique via les fèces, minimisant ainsi leur absorption dans la lumière intestinale (Zhang et Ohta, 1993).

En conclusion, le rôle du microbiote intestinal dans la cancérogénèse colorectal est une piste avancé de nos jours. Il est important de rechercher des traitements naturel tels que les probiotiques et prébiotiques ou encore les phytonutriments. Dans ce contexte, selon nos résultats préliminaires l'*Atriplex halimus* montre une modulation relativement due à son activité anti-bactérienne.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Actuellement, l'incidence du cancer augmente considérablement, alors que le traitement de celui-ci ne progresse pas à son rythme. La chimiothérapie est le traitement le plus recommandé dans ces cas, avec des effets secondaires importants détruisant les cellules normales. Cette ampleur nous pousse aujourd'hui à rechercher de nouvelles molécules naturelles.

Cette présente étude a été menée dans le but d'évaluer les effets préventifs et anticancéreux de l'*Atriplex halimus* dite «**Guetaf**». La problématique cruciale, à laquelle nous nous sommes intéressés, se résume dans l'induction du cancer colique par l'administration intrapéritonéale de la 1,2- diméthylhydrazine (DMH) à raison de 70 mg/kg chez les rats Wistar male.

Ce modèle de rat DMH possède de nombreuses caractéristiques du cancer colorectal sporadique humain, qui constitue un outil important pour l'étude des différentes étapes de cancérogénèse, et qui permet de tester et développer de nouvelles approches thérapeutiques qui ne peuvent pas être étudiés directement chez l'homme.

Dans ce sens, notre pays par sa position géographique abrite une biodiversité exceptionnelle de plantes aromatiques et médicinales. Nombreux sont utilisées dans les remèdes traditionnels et qui ne sont pas évaluées scientifiquement. A l'issue de ce travail l'utilisation *per os* de l'extrait de l'*Atriplex h* montrent que la plante a un effet préventif sur le développement du CCR surtout lorsque l'extrait de la plante est administré au même temps que le produit inducteur. Effectivement, Les antioxydants contenus dans l'extrait ont permis d'inhiber et minimiser l'effet promoteur du DMH traduit par un faible nombre d'AFC et la modulation du taux des marqueurs tumoraux ACE, CA19.9.

Par ailleurs, l'extrait administré à des fins curatives a démontré un effet chimio-protecteur sur le cancer colorectal induit. En effet, la supplémentation de l'extrait de la plante avec la chimiothérapie donne les meilleurs résultats, tous en conservant les fonctions vitales grâce aux propriétés: activatrice du système immunitaire, antioxydante et l'effet anti-inflammatoire accompli par l'extrait de la plante.

Cependant, des études supplémentaires sont à suggérer afin de déterminer les molécules actives et leurs modes d'action. Il serait donc souhaitable de poursuivre la recherche pour :

Conclusion

- 1- Etudier le profil du stress oxydatif
- 2- Réaliser une étude immunohistochimique
- 3- Doser des marqueurs génétiques : K-ras, P53, profil COX.
- 4- Etablir la phylogénèse du microbiote
- 5- Recherche des enzymes bactériennes responsables du clivage et la libération d'ion diazonium à savoir la β -glucuronidase.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Abbad, A., El Hadrami, A., El Hadrami, I., Benchaabane, A. (2004): Seasonal chemical composition of leaves of three *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) natural populations grown in a common garden. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 7 (2): 203-208

Abd El Monem M., Bker AA., Awad IM., Mohamed EM. (2013): Anticarcinogenic effect of *Raphanus Sativus* on 1.2 Dimethyl hydrazine (DMH) induced colon cancer in rats. *The Egyptian J of Hospital Medicine*. 51473-486.

Abdel-Rahman M., Hanaa H., Ahmed, Fatma El-Zahraa H. (2013): Curcuma longa and Colon Cancer: Evidence and Mechanisms. *World Journal of Medical Sciences*. 8 (3): 279-295.

Abdulaziz SS., Majid AJ., Basit LJ., Hassan M., et al (2020): Brucine Prevents DMH induced colon carcinogenesis in Wistar rats. *International journal of pharmacology*. 16(4): 319-329.

Aboura, R., Benmansour, D. et Benabadji, N. (2006) : Comparaison phytoécologique des *Atriplex* en Oranie (Algérie). *Ecol Med*, 32, 73-84.

Aggarwal B B, Vijayalekshmi R V, Sung B. (2009): Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*.15(2): 425-30.

Aharonson Z., Shani Mishkinsky J., Sulman F.G. (1969): Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a feeding source of the Sand Rat (*Psammomysobesus*), *Diabetologia*. 5(6): 379-383.

Ait Ouakrouch I. (2015): Enquête ethnobotanique à propos des plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète de type II à Marrakec. Université Cadi Ayyad Faculté de Medecine et de Pharmacie Marrakech. Pp :43

Ajibesin K, Bala N, Essein E, Adesanya SA. (2008) : Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*.115(3) : 387-408

Al-Farsi M., Alasalvar C., Morris A., Baron M., Shahidi F. (2005): Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties growth in Oman. *J. Agric. Food Chem*. 53: 7592–7599.

Andrea Azcárate-Peril M., Michael Sikes., Bruno-Bárcena, José M. (2011): The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for

Références Bibliographiques

probiotics in prevention of colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 301: 401–424.

Aruoma O.I., 1998. -Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of American Oil Chemist Society.*75: 199-212

Ashokkumar P., Sudhandiran G. (2008): Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacothe.* 62(9):590-7.

Aslam F., Palumbo L., Augenlicht L., Velcich A. (2001): The Sp family of transcription factors in the regulation of the human and mouse MUC2 gene promoters. *Cancer Res.*61:570-76.

Assam Assam JP., Dzoyem JP., Pieme CA., Penlap VB. et al. (2010): in vitro antibacterial activity and acute toxicity of aqueous –methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn (Malvaceae). *Complementary and Alternative Medicine.*40: 1-7.

Atmani D. (2009): Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants;*Food Chem.* 112, 303–309.

Attou S., Meddah B., Tir Touil A. (2020): phytochemical screening and antioxidant activity of Algerian *Aristolochia longa* flavonoids. *Journal of Applied Biotechnology Reports.*7(3):166-171.

Aurousseau B. (2002 : Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA. Product of Animal.* 15: 67-82.

B

Ba K, Tine E, Destain J, Cisse N, Thonart P. (2010): Comparative study of phenolic compounds, the antioxidant power of different varieties of Senegalese sorghum and the amylolytic enzymes of their malt. *Biotechnol. Agro. Soc. Environ.* (14) :131-139.

Baeuerle P A, Rupec R A, Pahl H L. (1996): Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathologie Biologie,* 44(1): 29-35.

Bahassan A, Zidane L, El Yacoubi H, A. Rochdi (2014):. Ethnobotany and taxonomy of medicinal plants used for diseases treatment of the digestive system in Hadramaout (Yemen).*Phytotherapie.*12: 399-416.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C. (1996): Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim. Forsch/Drug. Res.* 31:1-6.

Références Bibliographiques

Baker SJ., Fearon ER., Nigro JM., Hamilton SR., et al. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 244:217-21.

Balasundram N, Sundram K, et Samman S, 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.

Baldwin AS. (2001): Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*. 107(3):241-6.

Banchroft JD, Steven A, Turner DR. (2006): Theory and practice of histological technique 4th ed. Chirurgical liningstone. New York. London. San Francisco; Tokyo.

Bandyopadhyay M, Chakraborty R, Raychaudhuri U. (2007): A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *LWT*. 40(5): 842-51.

Bandyopadhyay D., Curry J L., Lin Q., Hunter W R. et al (2007): Dynamic assembly of chromatin complexes during cellular senescence: implications for the growth arrest of human melanocytic nevi. *Aging Cell*. 6(4): 577–591.

Barrow P., Khan M., Lalloo F., Evans DG, Hill J. (2013): Systematic review of the impact of registration and screening on colorectal cancer incidence and mortality in familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. *Br J Surg* .100:1719-31.

Barthod SW, Jonas AM. (1977): Morphogenesis of early 1,2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of *Citrobacterfreundii*. *Cancer Res*. 37(12): 4352-60.

Baser KHC .2002.Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Appl Chem* 74:527–545.

Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche HJR, et al. (2000): Update of recommendation for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin Oncol* . 19: 1865-1878.

Beaudeau L. (2008): Biochimie medicale, Marqueurs actuels et perspectives (2e ed.).575: 425.

Belenkii N., Sakharova E. (1939): Orach as a source of vitamin A. *Klim-ReferatZhur*. 12: 40.

Belhadj S, . Hadj-Mahammed, M.et Yousefi, M., (2015): Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de l'Atriplex halimus L et de l'Haloxylonscopariumpomel du Sahara septentrional. *Annales des Sciences et Technologie*, 7(11) : 258-264.

Références Bibliographiques

Bellakhdar J. (1997): La pharmacopée marocaine traditionnelle .Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. Pp :247.

Bellet D., Mlika-Cabanne N., Bedenne L., Brun B, et al. (1997) : Marqueurs sériques dans les cancers du sein et les cancers colorectaux ANAES.

Bellet D., Packing A. (2008) : Marqueurs tumoraux : utilisation clinique en 2008 et avancés récente. Rev Fr des LAB, Février 2008, suppléent au N°399.

Belouad A. (2001): Plants médicinales d'Algérie, éd. Office des publications universitaires, Alger, Pp :284.

Benhammou N., Bekkara F.A., Panovska T.K. (2009): Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*, *Comptes Rendus Chimie*, 12(12)1259-1266

Benhammou N.; Atik Bekkara F. and Kadifkova Panovska T (2009): Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*; C. R. Chimie 12: 1259–1266.

Benhammou-Belyagoubi N, Benyagoubi L, Atik Bekkara F. (2014). Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian Plants. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(40):1198-1207.

Bennani, H., Fiet, J. & Adlouni, A. (2009): Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone des Laboratoires*. 416: 23-26.

Beral V and Newton R (1998): Overview of the epidemiology of immunodeficiency-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*:1-6.

Bhaumik SR., Smith E., Shilatifard A. (2007): Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*.14:1008-16.

Billroth T. (1878): Lectures on surgical pathology and therapeutics. In: handbook for students and practitioners. London: The New Sydenham Society. Pp: 355.

Bird R P. (1998): Aberrant crypt foci system to study cancer preventive agents in the colon *Methods in Molecular Medicine: Tumor Marker Protocols*, Hanausek M. and Walaszek Z. Eds. Humana Press, Totowa, NJ, USA. Pp:465–474,

Bird, R.P. (1995): “Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer,” *Cancer Letters*. 93(1):55–71.

Blum C. A., Tanaka T., Zhong Z. et al. (2003): “Mutational analysis of *Ctnnb1* and *Apc* in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-

Références Bibliographiques

f]quinoline:mutational 'hotspots' and the relative expression of β -catenin and c-jun,"Molecular Carcinogenesis. 36(4):195–203.

Boizot N., Charpentier J.P. (2006) : Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA, INRA, Pp:79-82.

Boland C. R., Goel A (2010) : Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology. 138(6):2073-2087 .

Bolla M., Martin P. (1989): Les marqueurs tumoraux Paris : Masson, 1989

Bon JH. (2000): Polyp guideline: diagnosis, treatment and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol. 95:3053-63.

Bouchoucha M.,Quezeta R.(2018) : Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité hypoglycémiante et anti-hyperglycémiante de l'extrait méthanolique d'*Atriplex halimus.L.* université des Frères Mentouri, Constantine-1-,92p.

Boudin B. (2013): Test septine 9 et cancer colorectal ou comment améliorer son dépistage

Bouhadjra. K. (2011) : Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri .Tizi-Ouzou. Pp : 42.

Boulaouad A., Bouhafs Y et Maadi A.R (2018): Etude de l'activité antioxydante des extraits de la plante médicinale *Atriplex halimus ssp. schweinfurthii*.Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj. Pp : 20-40.

Breskvar L., Cerar A. et al., (1997): A role of gender in the occurrence of dimethylhydrazine induced colorectal tumors in Wistar rats. Radiology and Oncology. 31 (4): 374–379.

Bruneton J. (2009) : Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4e édition.

Buer C S, Gloria K M and Djordjevic M A, 2007. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in Arabidopsis. *Plant physiology*, 145:478-490.

Burda S., Oleszek W. (2001): Activités antioxydantes et antiradicalaires des flavonoïdes. *J. Agric. Chimie alimentaire*. 49(6) : 2774–2779.

Burny L. (2010) : Les effets secondaires des traitements anti-cancéreux. Edition Septembre 2010.

Références Bibliographiques

- Bylka W, Stobiecki M, Franski R, 2001.** Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23 (3): 285-290.
- Bylka, W. (2004):** A new acylated flavonol diglycoside from *Atriplex littoralis*. *Acta Physiol Plant*. 26(4), 393- 398.
- Bylka, W., Stobiecki, M., Frański, R. (2001):** Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. *Acta Physiol. Plant*. 23(3), 285-290.
- *C*
- Cahill DP., Lengauer C. , Yu J. et al. (1998):** Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 392 :300-303.
- Cairns R A, Harris I S, Mak T W. ():** Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, vol. 11(2):85-95
- Camerer E., Qazi AA., Duong DN., Cornelissen I., et al. (2004):** Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*. 104:397-401.
- Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S. et al. (2007):** Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol*. 189(16):5929-36.
- Carethers JM., Jung BH. (2015):** Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 149 (5):1177-1190.
- Carman RJ, Van Tassell RL, Kingston DG, Bashir M, Wilkins TD. (1988):** Conversion of IQ, a dietary pyrolysis carcinogen to a direct-acting mutagen by normal intestinal bacteria of commensal microbiota. *FEMS Microbiol Lett*. 244(1):1-7.
- Castellarin M., Warren RL., Freeman JD., Dreolini L., et al. (2012):** *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. 22: 299–306.
- Castroviejo S et al. (2007).** *Flora Iberica*. vol. 2. S. Castroviejo. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., eds., Madrid. Pp: 504-505.
- Catinean A, Neag MA, Muntean DM, Bocsan IC, Buzoianu AD. 2018.** An overview on the interplay between nutraceuticals and gut microbiota. *Peer J* 6:e4465. <https://doi.org/10.7717/peerj.4465>
- Cetkovic G ., Canadanovic-Brunet J ., Djilas S. et al. (2008):** Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109:340-347

Références Bibliographiques

Chavéron H. (1999) : Molécules toxiques. Dans « Introduction à la toxicologie nutritionnelle» .TEC & DOC. Lavoisier. Paris. Pp: 98.

Chen H., Xu J., Hong J., Tang R., Zhang X., Fang JY. (2014): Long noncoding RNA profiles identify five distinct molecular subtypes of colorectal cancer with clinical relevance. *Mol Oncol.* 8:1393-403.

Cheng JL., Futakuchi M., Ogawa K., Iwata T. et al. (2003): Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2- dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett*, 2003; 196:161-168.

Chang W W L. (1984): “Histogenesis of colon cancer in experimental animals,” *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 19: 27–43.

Cherrington C.A., Hinton M., Mead G.C., Chopra I. (1991): Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. *Advances in Microbial Physiology.*32 :87-108.

Chihara N., Amo T., Tokunaga A., Yuzuricha R. et al.(2011): Des altérations de l'ADN mitochondrial dans des lignées cellulaires de cancer colorectal. *J Med Nippo Sch.* 78(1):13-21.

Chikhi I., Allali H., Dib M. et al. (2014): Antidiabetic activity of aqueous aerial part extract of *Atriplex halimus* L.(Chenopodiaceae) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats . *Asian Pacific Journal ofTropical Biomedicine (APJTB)*, 4(3): 181–184.

Chow J, Mazmanian SK.(2010): A pathobiont of the microbiota balances host colonization

Christelle M. (2005): Etude de la fonction de l'Alpha-foetoprotéine. Université libre de Bruxelles.

Cohen SM, Purtilo DT and Ellwein LB (1991): Ideas in pathology. Pivotal role of increased during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(5):313-23.

Collins D, Hogan AM, Winter DC. (2011): Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol.*12(5):504-12.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009): Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 30(7):1073-81.

Copland W-C., Wachsman J., Johnson F-M., Penta J-S. (2002): Mitochondrial DNA Alterations in Cancer.*Cancer Investigation.* 20(4):557-569.

Références Bibliographiques

Corpet D E. and Pierre F. (2005): How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer*. 41(13):1911–1922.

D

D'Abrosca B., Pacifico S., Cefarelli G., et al. (2007): 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry* Volume 104, Issue 4, 2007, Pages 1333-1337.

Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris. Pp :317.

Daly-Schweitzer N. (2011) : Suivi médical du patient traité pour un cancer ; page : 21-22.

Davis CD, Milner JA. (2009): Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem*. 20(10):743-52.

Dawidowicz A, wianwoska D, Baramiak B, 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *Food Science and Technology*. 39: 308-315.

De Filippo C., Caderni G., Bazzicalupo M. et al. (1998): "Mutations of the Apc gene in experimental colorectal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats," *British Journal of Cancer*. 77(12): 2148–2151.

De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. & Lekeux P. (2005): Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Animale. Médecine. Vétérinaire*.149:1-9.

De Moura NA., Caetano BF., Sivieri K. et al. (2012): Protective effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 50(8): 2902-10.

Deaton CHM. Marlin DJ. (2003): Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*. 2(3): 278-91.

Decloître, F, Puiseux-Dao S. (1993) : Mécanismes épigénétiques de la cancérogenèse. Dans *Cancérogenèse, Aspects génétiques et épigénétiques, Mécanismes et méthodes d'évaluation*. Eds, F. Decloître et Y. Moulé, Association Toxicologie- CNAM, Paris. Pp:53-93.

Références Bibliographiques

Dehpour A., Ibrahimzadeh M A., Fazel N, Mohammad N. (2009): Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*. (60): 405-412.

Dejardin E. (2006): The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1161-79.

Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Ed. (2003) : Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires . Paris : Medecine-sciences Flammarion.59-81.

Delattre O., Olschwang S., Law DJ., Melot T., Remvikos Y., et al. (1989): Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet*. 2:353-6.

Denis I., Beudonnet A., Pichot J., Roubille M., Gelineau M.C. (2000): Mise au point d'une methode de dosage de l'alpha-foetoprotéine fucosylée et evaluation dans le diagnostic biologique du carcinome hepato-cellulaire sur cirrhose. *Ann Bio Clin*. 581 : 85-90.

Desbene C., Gaillard O. (2013): Caractéristiques immun analytiques de l'Antigène carcino-embryonnaire Immuno-analyse et biologie spécialisée. 28: 378-385.

Desgrandchamps F., Soussi T. (2001): Sérologie p53 dans les tumeurs de vessie. *Sep 2001*. 6(1a): 11-99.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capass, F.(1999): Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci*. 65(4): 337-53.

Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R. & Perluigi, M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 737–747.

Di Fiore F., Michel P. (2009) : Rôle pronostique des mutations du gène KRAS dans le cancer colorectal. *Bull Cancer*, December 2009; vol. 96.

Djellouli, M. Moussaoui, A., Benmehdi, H. (2013): Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south west Algeria. *Asian Journal of Natural and Applied Sciences*, 2(2):59-65.

Djeridane A., Yousfi M., Ndjemi B. (2003): Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin de société de pharmacie de Bordeaux*. 142 :61-78.

Dos Santos J.R., Fleurentin J. (1990) : L'ethnopharmacologie: une approche pluridisciplinaire. Actes du 1er colloque Européen d'Ethnopharmacologie, Metz 22-25 mars 1990. Société Française d'Ethnopharmacologie, ORSTOM.

Références Bibliographiques

Dubois J-B., Grenier J. (2000): Les marqueurs tumoraux : De la théorie à la pratique Montpellier : édition 34, 2000.

Duffy MJ. (2001): Carcinoembryonic antigen as a marker for Colorectal cancer: is it clinically Useful. *CliniChem.* 47(4): 624-30.

Duffy, M.J. (1998): CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: A review. *Ann. Clin. Biochem.* 35, 364–370.

Duval A., Hamelin R. (2002): Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 62:2447-54.

E

Ebrahimzadeh MA, Pourmmorad F, Hafezi S, 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk J Biol*, 32: 43-49.

Eche N., Pichon M-F., Quillien V., Gory-Delbaere G.et al. (2001): Standards options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer. *Bull Cancer.* 88:1177-206

Edeas M, Attaf D, Mailfert S. et al. (2010): Maillard Reaction, mitochondria and oxidative

Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, Gu`rel A, Aktas, L, Gesheva E .2008. Stressprotective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol* 34:67–78.

El- Haci, I. A., Bekhchi, C., Atik-Bekkara, F. (2014): Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algerian Sahara, *Natural Product Communication*, 9(5): 711-712.

El Kalamouni C. (2010) : Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Doctorat de l'Université de Toulouse, institut National Polytechnique de Toulouse. spécialité : Sciences des Agro ressources.Pp:107.

El-Hawary, S. A., Sokkar, N. M., Ali, Z. Y., Yehia, M.M. (2011): A Profile of Bioactive Compounds of *Rumex versicarius* L. *Journal of Food Science.* 76(8):195-1202.

Elicoh-Middleton Jr. Chithan K., Theoharis C. (2000): Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.

El-Waziry A.M. (2007): Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique; *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605-614.

Emam S.S. (2011): Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of Natural Products.* 4: 25-41.

Références Bibliographiques

Emile C. (2012): Intérêt de la septine 9 dans le cancer colorectal. Option Bio. N° 481.

Esteller M. (2007): Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet. 8:286-98.

F

Falleh H, Jalleli I, Ksouri R, Boulaaba M, Guyot S, Magné C, Abdely C, 2012. Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiol. Biochem*, 52: 1-8.

Fani G., Costas V., Maria K., Georgia S. et al. (2018): Beneficial effect of synbiotics on experimental colon cancer in rats. The Turkish Society of Gastroenterology. 29: 494-501.

Favier, A. (2003): Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 108-115.

Fearon and Vogelstein. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 61 (5):759-67.

Fearon E. R. (2015): Molecular genetics of colorectal cancer. Annual review of pathology: mechanisms of disease. 6 :479-507.

Felleh H, Ksouri R, Abdely C, 2007. Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage, *Cynara cardunculus*. Revue des régions Arides. 1: 341- 344.

Femia A M. and Caderni G (2008): Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica*, 74(13): 1602–1607.

Femia AP, Luceri C, Toti S, Giannini A, Dolara P, Caderni G. (2010): Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC Cancer*.10:194.

Fiala E.S., Stathopoulos C. (1984): “Metabolism of methylazoxymethanol acetate in the F344 rat and strain-2 guinea pig and its inhibition by pyrazole and disulfiram,” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*.108 (1):129-134.

Finley L W, Carracedo A, Lee J. et al. (2010): SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*. 19(3): 416-28.

Fodde R., Smits R., Clevers H. (2001): APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* .1:55-67.

Forstner JF, Olivier MG, Sylvester FA, (1995): editors. Production, structure, and biologic. *Gastroenterol*. 24(4):435-9.

Références Bibliographiques

Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, et al. (2005): Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30):10646-51

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, et al. (2007): Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(34):13780-5.

Fruehauf J P, Meyskens F L, Jr. (2007): Reactive oxygen species : a breath of life or death ? *Clin Cancer Res.*13(3): 789-94.

Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Yonemoto K, et al. (2009): Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57 (4):1253-1259.

G

Gupta A, Singh P.P, Singh P, Singh K, Singh AV, Singh SK, Kumar A.2019. Medicinal Plants under Climate Change: Impacts on Pharmaceutical Properties of Plants: Chapter 8 in *Climate Change and Agricultural Ecosystems.* ISBN 978-0-12-816483-9, DOI: 10.1016/B978-0-12-816483-9.00008-6. 55p.

Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. (2010): Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.*140(6):859-70.

Gasic GJ., Gasic TB., Stewart CC. (1968): Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 61: 46-52.

Gaucher A-S., Brandi F-X. (2005): Place de la biologie dans la prise en charge du cancer colorectal *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique.* 29 (2).

Ge Z, Schauer DB, Fox JG. (2008): In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* 10(8):1599-607.

Geiger T.R., Peeper D. S., (2009) : Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1796 (2):293-308.

Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M. (2003): Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *American Association of Pharmaceutical Scientists.* 2: Pp:5.

Gibson GR. (2008): Prebiotics as gut microflora management tools. *J Clin Gastroenterol.*42 Suppl 2:S75-9.

Gill P., Wang LM., Bailey A., East JE., Leedham S., Chetty R.. (2013): Reporting trends of right-sided hyperplastic and sessile serrated polyps in a large teaching hospital over a 4-year period (2009-2012). *J Clin Pathol.* 66:655-8.

Références Bibliographiques

Gill P., Wang LM., Bailey A., East JE., Leedham S., Chetty R.. (2013): Reporting trends of right-sided hyperplastic and sessile serrated polyps in a large teaching hospital over a 4-year period (2009-2012). *J Clin Pathol* .66:655-8.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, et al. (2006) :Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1355-9.

Goelz SE., Vogelstein B., Hamilton SR., Feinberg AP. (1985): Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*.228:187-90.

Gold JS., Bayar S., Salem RR. (2004): Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Arch Surg*. 139: 760–765.

Goudable J, Favier A. (1997) : Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique & Métabolisme*. 11(2):115-120

Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6): 883-99.

Grivennikov SI, Karin M. (2010): Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*.21(1):11-9.

Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, et al. (2018): Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*.378(13):1177-1188.

Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S et al. (2013): Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 381:303-12.

Groussard C. (2006) : Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Oxidative stress and anaerobic exercise*. *Science & Sports*. 21 : 201-209.

Guignard J.L et Dupont F. (2004): Abrégé de Botanique, Systématique moléculaire. 13 ème édition, Masson, Paris.

Guldenfels IC, Briançon S, Houot O, Junod B, Deschamps J-P. (1990): Comparaison du rapport coût/efficacité de deux tests de dépistage des tumeurs colo-rectales dans un centre d'examen de sante. *Acta Endoscopica*. 20: 27-32.

Guo X, Evans TR, Somanath S, Armesilla AL, et al. (2007): In vitro evaluation of cancer-specific NF-kappaB-CEA enhancer-promoter system for 5-fluorouracil prodrug gene therapy in colon cancer cell lines. *Br J Cancer*. 97(6):745-54.

Gurib-Fakim A. (2006): Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* ; 27: 1 - 93.

Gutteridge J MC., Mitchell J. (1999): Redox imbalance in the critically ill. *British Medical Bulletin*, 55 (1):49–75.

Références Bibliographiques

Gaillard O.(2001): CA19-9 Immunoanal boil spec. 16: 244-245

H

El Hilaly J., Israili Z.H., Lyoussi B. (2004): Acute and chronic toxicological studies of *Ajugaiva* in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology. 91(1) :43-50.

Hackbarth J.S., Murata K., Reilly W.M., Algeciras-schimmich A. (2010): Performance of CEA and CA 19-9 in identifying pleural effusions caused by specific malignancies. Clink Biochemist. 43: 1051–5.

Hackbarth J.S., Murata K., Reilly W.M., Algeciras-schimmich A. (2010): Performance of CEA and CA 19-9 in identifying pleural effusions caused by specific malignancies. Clink Biochemist. 43: 1051–5.

Halimi A. (2011) : Les plantes médicinales en Algérie, 1ère édition, Edition DERTI, Alger. Pp : 214.

Hamelin R., Chalastanis A., Colas C. et al. (2008): Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. Bull Cancer .95:121-32.

Hamiza OO., Rehman MU., Tahir M. et al. (2012): Amelioration of 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) Induced Colon Oxidative Stress, Inflammation and Tumor Promotion Response by Tannic Acid in Wistar Rats. Asian Pac J cancer Prev. 13(9): 4393-402.

Hammel P., Soussi T. (2000): Le dosage sérique de l'anticorps anti-p53 : application au cancer colorectal. Rev Méd Interne. 21: 167-73.

Hanahan D, Weinberg R A. (2011): Hallmarks of cancer : the next generation. Cell. 144(5): 646-74.

Hanahan D, Weinberg R A.(2000): "e hallmarks of cancer. Cell. 100(1):57-70.

Harie A.N. (1947): Utilization of wildly growing edible plants as means of counteracting a vitaminoses A & D. *Miditsin Stestra.* 6: 25-26.

Hass R., Busche R., Luciano L et al. (1997): Lack of Butyrate Is Associated With Induction of Bax and Subsequent Apoptosis in the Proximal Colon of Guinea Pig. Gastroenterology. 112: 875–881.

Hamdi A., Tir Touil A. (2022): Antimicrobial Potency of Atriplex halimus Extracts against the Pathogen *Vibrio cholera*.phytothérapie. phytothérapie, 0318:1-9.

Références Bibliographiques

Hayouni E., Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M.(2007): The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts; *Food Chem.* 105, 1126-1134.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.*390:465-71.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.*390:465-71.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004): Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* 1: 3-6.

Heo HJ, Kim YJ, Chung D, Kim DO. (2007): Antioxidant Capacities of Individual and Combined Phenolics in a Model System. *Food Chem.* 104(1): 87-92

Heo K , Lee BI , Yi SD , Huh K , Kim JM . (2007): Efficacité et innocuité du lévétiracétam comme traitement d'appoint des crises partielles réfractaires dans un essai multicentrique ouvert à un seul bras chez des patients coréens .*Saisie.* 16: 402 – 409.

Heyer J., Yang K., Lipkin M., Edelman W., and Kucherlapati R. (1999):Mouse models for colorectal cancer. *Oncogene.*18(38):5325–5333.

Hitchins MP. (2013): The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 12:189-205.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002): Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* 139: 1–21.

Hoensh H.P.; Oertel R. (2015): The value of flavonoids for the human nitritions: Short review and perspectives. *Clinical Nutritions Experiments*, v.3, p.8-14, 2015.

Hope ME, Hold GL, Kain R, El-Omar EM. (2005): Sporadic colorectal cancer--role of the

Horst D, Reu S, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. (2009): The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer.*115(10):2063-70.

HsuJu. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 : 296- 302.

Huang C., Sloan EA., Boerkoel CF. (2003): Chromatin remodeling and human disease. *Curr Opin Genet Dev.*13:246-52.

Références Bibliographiques

Huang D., Ou B., Prior R.L (2005): The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 1841–1856.

Huycke MM, Gaskins HR. (2004): Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med (Maywood)*. 229(7):586-97.

Hwang P M, Bunz F, Yu J, et al. (2001): Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil- induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med*, 7(10):1111-7.

I

Imahori Y., Takemura M., Bai J. 2008. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol Technol*.49:54–60.

Irizarry RA., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z. et al. (2009): The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 41:178-86.

Issa JP.(2004): CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*.4:988-993.

J

Jasperson KW., Tuohy TM., Neklason DW., Burt RW. (2010): Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*.138:2044-2058.

Jdaidi N, Hasnaoui B. (2016): Floristic And Ethnobotany Study Of Medicinal Plants In North-West Tunisia : Cas De La Communauté D'ouled Sedra. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. 3(1): 281-291.

Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M & Yusuf S. (1995): The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Annals of Internal Medicine*. 11:860-72.

Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. (2008): Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 7(2):123-9.

K

Kang SY., Park CK., Chang DK., Kim JW., et al (2015): Lynch-like syndrome: characterization and comparison with EPCAM deletion carriers. *Int J Cancer*. 136:1568-78.

Kawatra S., Taranalli A. , Gaidhani S. , Khanduri S. (2015): protective effect of *Lantana camara* L. against 1,2 Dimethyl hyzrazine induced colon cancer in rats. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 4(10):845-860.

Références Bibliographiques

Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, et al. (2004): Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol.* 5(1):104-12.

Khan M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., Khan, N.A. (2015): Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 462.

Killian A., Di Fiore F., Le Pessot F. et al. (2007): A simple method for the routine detection of somatic quantitative genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology.*132: 645-53.

Kim Y S. and Milner J A. (2007): Dietary modulation of colon cancer risk. *Journal of Nutrition.* 137(11):2576– 2579.

Kinzler KW. and Vogelstein B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.*87:159-70.

Kirakosyan A, Seymour E, Kaufman PB, Warber S, et al. (2003): Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agric Food Chem,* 51:3973–3976.

Kostic AD., Gevers D., Pedomallu CS., Michaud M., et al. (2012): Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22: 292–298.

Koukourakis MI., Giatromanolaki A., Sivridis E., et al. (2011): Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with ptk787/zk 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res.* 17(14): 4892-903.

Kraus S, Arber N. (2009): Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 9(4):405-10.

Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N.,(2008): Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes; *C. R. Biol.* 331, 865- 873.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H. et al. (2007): Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch.* 45: 244-249.

Kudatarkar NM., Nayak YK. (2018): Pharmacological Screening of *Cassia alata* Leaves on Colorectal Cancer. *iMedPub Journals.* 4 (1):02-09.

Références Bibliographiques

L

Labelle M., Hynes R. O. (2012) : The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discovery*. 2 (12): 1091-1099.

Lacave R, Larsen C-J, Robert J. (2005): Cancérologie fondamentale. Paris : John Libbey Eurotext. Pp: 437.

Laethan V. (2013): Cancer colorectal : nouveaux traitements L'encyclopédie des maladies, Belgique.

Lambert, J. D. & Elias, R. J. (2010): The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 501: 65-72.

Lamoril J., Ameziane N., Deybach J-C., Bouizegarene P., Bogard M. (2009): KRAS et cancer colorectal : un pas de géant vers la médecine personnalisée. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 24: 196-209.

Lanore D., Delpart CH. (2002): Chimiothérapie anticancéreuse. Elsevier Masson. Pp : 17.

Lao VV., Grady WM. (2001): Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* .8:686-700.

Laurent-Puig P. (1997): L'apport des techniques moléculaires dans le dépistage du cancer colorectal *Gastroenterol Clin Biol*. 21:751-753.

Lazurevskii, G.V, Terntieva I. V, Shamshurine A. A. (1966). *Prakticheskie raboty po khimii prirodnyx soedinenii*. Moscou, 335. (traduit du russe).

Le Houerou H.N. (1993): Salt tolerant plant of the arid regions of the Mediterranean isoclimatic zone in: Towards the rational use of high salinity tolerant plant. Leith H. and Almasoom A. Eds. Kluwer academic publishers. 1: 403-422.

Leary RJ., Lin JC., Cummins J. et al. (2008): Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* .105:16224-9.

Leconte T., Ceze N., Dorvale E., Laurent-Puig P. (2010): Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*. 34 (12): 662-81.

Références Bibliographiques

Lecrubier A. (2012): Cancer du côlon : prédire la résistance aux anti-EGFR par prise de sang. Medscope France, juin 2012.

Lee J., Koo N. & Min D.B. (2006): Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1: 21-33.

Lefebure B., Charbonnier F., Di Fior F., Tuech J-J. et al. (2009): Rôle pronostique de l'ADN mutant circulant dans le plasma des patients pris en charge pour cancer colorectal métastatique. *Gastroenterol Clin Biol*, 33.

Lengauer C., Kinzler KW., Vogelstein B. (1997): Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 386 :623–627.

Leong, LP., Shui, G. (2002): An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, et al. (2008): Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 320(5883):1647-51.

Lianopoulou V., Bosabalidis AM. 2014. Traits of seasonal dimorphism associated with adaptation to cold stress in *Origanum dictamnus* L. (Lamiaceae). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21:17. <http://www.jbiolres.com/content/21/1/17>

Lianopoulou V., Bosabalidis AM., Patakas A., Lazari D., Panteris E. 2014. Effects of chilling stress on leaf morphology, anatomy, ultrastructure, gas exchange, and essential oils in the seasonally dimorphic plant *Teucrium polium* (Lamiaceae). *Acta Physiol Plant*. 36: 2271-2281. DOI: 10.1007/s11738-014-1605-x.

Lievre A., Laurent- Puig P. (2005): Mutations de l'ADN mitochondrial et cancer colorectal. *Gastroenterol Clin Biol*. 29:33-40.

Link, A., Balaguer, F. & Goel, A. (2010): Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*. 80: 1771-1792.

Liu G, Chen X. (2002): e ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21(47):7195-204

Loric S., Moutereau O. (2008): Laboratoire de biochimie et génétique, hôpital Henri-Mondor, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil cedex, France.

Loric S., Moutereau O. (2008): Laboratoire de biochimie et génétique, hôpital Henri-Mondor, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil cedex, France.

Lubin R. (1998): Anticorps sériques anti-P53 : un nouveau marqueur tumoral *Immunoanal Biol Spéc. ELSEVIER*. Paris. 13:127-135.

Références Bibliographiques

Lubin R. (1998): Anticorps sériques anti-P53 : un nouveau marqueur tumoral
Immunoanal Biol Spéc. ELSEVIER. Paris. 13:127-135.

Luis FP, Svetomir NM. (2010): Is absolute lymphocyte count just another prognostic
factor in cancer?. SRX Medicine, 2010: 1-8.doi:10.3814/2010/812304.

Lynn N., Daniel F., Hayes B. (2012): Cancer biomarkers, University of Michigan

M

Macdonald TT, Monteleone G. (2005): Immunity, inflammation, and allergy in the
gut.

Magnani, J.L.; Nilsson, B.; Brockhaus M. et al. (1982): A monoclonal antibody-
defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated
lacto-N-fucopentaose II. J. Biol. Chem. **1982**, 257, 14365–14369.

Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ. et al. (2009): Characterizing a
model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc
Natl Acad Sci U S A. 106(14):5859-64.

Mai V, McCrary QM, Sinha R, Gleib M. (2009): Associations between dietary habits
and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an
observational study in African American and Caucasian American volunteers. Nutr J.8:49.

Malddonado A., Sancho F., Cerdan J., Lozano A. et al. (2000): 16.FDG-PET in the
detection of Recurrence in Colorectal Cancer Based on Rising CEA Level. Experience in 72
Patients. Clin Positron Imaging. 3(4):170.

Mandel JS., Church TR., Bond JH., Ederer F., et al. (2000): The effect of fecal
occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. N Engl J Med. 343: 1603-1607.

Manning B D, Cantley L C. (2007): AKT/PKB signaling : navigating downstream.
Cell. 129(7):1261-74.

Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., et al. (2004) : Méthodes
d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. Erudit, M/S: Médecine Sciences.
20(4): 458-463.

Markowitz SD., Bertagnolli MM.(2009): Molecular origins of cancer: Molecular basis
of colorectal cancer. N Engl J Med .361:2449-60.

Références Bibliographiques

Marolla M., Lefrere F. Traineau R. (2008): Hématologie, transfusion sanguine et soins infirmiers. France. Wolters Kluwer. Pp : 42

Martin FP, Dumas ME, Wang Y, Legido-Quigley C. et al. (2007): A topdown systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol Syst Biol.* 3:112.

Massagué J. (2008): TGFbeta in Cancer. *Cell.*134:215-30.

Massion P., Preise R.J.C. & Balligand J.L. 2002.- Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. Reactive nitrogen species : deleterious or not. *Nutrition clinique et métabolisme.* 16: 248-252

Maynard CL, Weaver CT. (2009): Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity.* 31(3):389-400.

Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. (2008): A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* 453(7195):620-5.

McConnell BB, Yang VW. (2009): The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.*5(2):69-74.

McIntosh GH., Royle PJ., Playne MJ. (1999): A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer.* 35: 153–159.

McKell C.M. (1994): Salinity in *Atriplex* species: fodder shrubs of arids lands. In: *Handbook of plant and crop physiology.* Ed. Pessaraki M. and Marcel Dekker.

McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, Aye PP. et al. (2008): The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog.* 4(2):e20.

McLellan EA, and Bird RP. (1988): Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* 48: 6187–6192. 1988

McMahon T. F., Peggins J. O., Centra M. M. and Weiner M. (1990): “Age-related changes in biotransformation of azoxymethane and methylazoxymethanol in vitro,” *Xenobiotica,* 20(5):501–513.

Medina-Navarro, R., et al. (2010): Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function. *PloS One.* 5(1):8971.

Mercadal L. (2015): Marqueurs tumoraux dans l'insuffisance rénale chronique. Pp: 771.

Mertelsmann R., Engelhardt M., Berger P. D., Moreau P. (2011) Précis d'hématologie et d'oncologie. Springer. Janvier 2011. Pp: 47.

Références Bibliographiques

Mertz W., Rosinski E.E., Gordon W.A. et al. (1973): In vitro potentiating of insulin by ash from Saltbush (*Atriplex halimus*). *Arch. Int. Pharmacodyn.* 206(1): 121-182.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol*

Migdal M. (2011): Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine science.* 27 (4): 405-412.

Mikkelsen R B, Wardman P. (2003): Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation- induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 22(37): 5734-5754.

Mirsky et Nitsa. (2001): Naturally extracted and synthetic hypoglycemic or hypolipidemic compositions. Application N°. US 09/842971. [http:// www.freepatentsonline.com](http://www.freepatentsonline.com).

Mohamed Ghourri, Lahcen Zidane, El Yacoubi Houda et al. (2012): Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville d'El Ouatia (Maroc Saharien). *Journal of Forestry Faculty.* 12(2): 218-235.

Mori H., Hata K., Yamada Y., Kuno K., and Hara A. (2005): "Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis," *Chemico-Biological Interactions.*155 (1-2):1-9.

Mori H., Yamada Y, Kuno T., and Hirose Y. (2004): "Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis," *Mutation Research.* 566(3):191-208.

Morin PJ., Sparks AB., Korinek V. et al. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 275:1787-90.

Mukinda JT, Syce JA.2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 138-144.

Murphy KM, Travers P, Walport M, (2008): editors. *The mucosal immune system.* London: Garland Publishing Inc.

N

N'Guessan A H O, Dago Déliko CE, Mamyrbékova-Békro JA, Béko YA, 2011. Teneurs en composé phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de

Références Bibliographiques

l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de Génie Industriel*.6: 55.

Nadembega P, Issak Boussim J, Nikiema JB, Pli F, Antognoni F. (2011): Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province. Burkina Faso: An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology*.133(2): 378-395.

Nakagama N., Ochiai M., Ubagai T. et al.(2002): A rat colon cancer model induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine, PhIP. *Mutation Research*. 506-507:137-144.

Neish AS. (2009): Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 136: 65-80.

Neish AS. (2009): Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 136(1):65-80

Neri F., Dettori D., Incarnato D., Krepelova A., Rapelli S., et al.(2015): TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene*. 34:4168-76.

Neuville A. (2010) : Carcinogénèse colique : sous typage moléculaire des étapes précoces du cancer du côlon de phénotype non-MIN. Pp : 97.

Nishida N., Nagasaka T., Kashiwagi K. et al. (2007): High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers. *Cancer Biol Ther*.6: 525-33.

O

O'Keefe SJ, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR. et al. (2007): Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr*.7:175-82.

O'Keefe SJ, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR. et al. (2007): African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr*. 137:175-82.

O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D. et al. (2009): Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr*. 139(11):2044-8.

Okugawa Y, Grady WM, Goel A. (2015): Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. 5085(15)01005-7.

Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. (2008): Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*. 44(7):946-53.

Références Bibliographiques

Organisation for Economique Cooperation and Development (OECD)(2002): Guidelines of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.Procedure 423. Paris.

Organisation for Economique Cooperation and Development (OECD)(2008): Guidelines of Chemicals: Oral repeat dose toxicity study for 28 days in rodents Method. Procedure 407. Paris.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, et al. (1996): Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 87:803-9.

Otori K., Sugiyama K., Hasebe T, Fukushima S, Esumi H. (1995): “Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in

Ozben T. (2007): Oxidative Stress an Apoptosis : Impact on Cancer "erapy. Journal of Pharmaceutical Sciences. 96(9):2181-2196.

Ozdal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F et al. 2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. Nutrients 8:78. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>

Ozenda P. (2004): Flore et végétation du Sahara. Paris. 30(2). Pp:247

P

Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. (2010): Metastasis : cancer cell's escape from oxidative stress. Cancer and Metastasis Reviews. 29(2):351-378

Park H J, Cha H C. (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. Korean journal of biological society. 7: 327-330 .

Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., and Pisani P., (2005):“Global cancer statistics, 2002,” CA Cancer Journal for Clinicians 55(2): 74–108, 2005.

Parkin DM. Bray F., Ferlay J., and Pisani P. (2005): Global cancer statistics, 2002. CA Cancer Journal for Clinicians. 55(2):74–108.

Pauli A., Rinn JL., Schier AF. (2011): Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. Nat Rev Genet.12:136-49.

Pedron T, Sansonetti P. (2008): Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois. Cell Host Microbe. 3(6):344-7.

Pei Y.Q. (1983) : “A review of pharmacology and clinical use of piperine and its erivatives”, Epilepsia. 24:177-182.

Références Bibliographiques

Pennington J D, Wang T J C, Nguyen P. et al. (2005): Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*. 8(5):322-330.

Perse M., Cerar A. (2005): The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat experimental colorectal carcinogenesis. *Radiology and Oncology*. 39 (1): 61–87.

Perse M., Mlinaric V., Cerar A. (2010): “Aberrant crypt foci as biomarkers predictive of colorectal carcinoma,” *Slovenian Medical Journal*. 79(6): 499–506.

Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. (2008): Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*.12;3(6):417-27.

Petti S et Scully C. (2009) : polyphénols, santé bucco-dentaire et maladies : une revue. *Journal of Dentistry* , 37, 413-23.

Phelip JM., Bouché O., Conroy T. et al. (2014) : Cancer colorectal métastatique. *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*. Pp : [<http://www.snfge.org/tncd>]

Piccolella S, Crescente G, Pacifico F, Pacifico S. 2018. Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly) phenol seasonality? A case study from Mediterranean area. *Phytochem Rev* <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9558-0>

Pincemail J. & Defraigne J.O. (2004) : Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l’oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone.

Pincemail J., Defraigne J.O. & Limet R. (2001): Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. *Medi Sphère*. Pp:130.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J. (2002): Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*.16(4), 233-239.

Potter JD. (1996): Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes and Control*. 7: 127-146.

Powell SM., Zilz N., Beazer-Barclay Y., et al. (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 359:235-7.

Pretlow T. P.,Barrow B.J., Ashton W. S. et al. (1991): “Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa,” *Cancer Research*. 51(5):1564–1567.

Pretlow TP., O’Riordan MA. , Pretlow TG., Stellato TA. (1992): Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J Cell Biochem Suppl*.16:55-62.

Prinsloo G., Nogemane N. 2018. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. *Phytochem Rev*. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9567-z>.

Références Bibliographiques

Prost P., Ychou M., Azria D., Topart D. (2002): Marqueurs tumoraux et cancers du tractus gastro-intestinal Encyclopedie medico-chirurgicale. Pp: 9.

Q

Qiu JJ., Yan JB. (2015): Long non-coding RNA LINC01296 is a potential prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol.*36:7175-83.

Qiu JJ., Yan JB. (2015): Long non-coding RNA LINC01296 is a potential prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol.*36:7175-83.

R

Rached.W. (2009): Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique, thèse de magistère.

Rachel G. (2002): Etude de l'action de la vitamine A sur le risque de cancer colique a lié a une surcharge lipidique. Pp :18.

Radtke F., Clevers H. (2005): Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science.* 307: 1904-1909.

Rahman A.U, Nasim S., Baig I., Jalil S., Orhan I., Sener B., Choudhary M.I. 2003.- Antiinflammatory isoflavonoids from rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3): 177-180.

Rahman K. (2007): Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2(2) : 219–36.

Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C. et al. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* .418:934.

Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. (2007): Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol.* 9(9):2125-36.

Rawls JF. (2007): Enteric infection and inflammation alter gut microbial ecology. *Cell Host*

Raza M., Al-Shabanah O.A., El-Hadiyah T.M., Al-Majed A.A., 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss *albino* mice. *Scientia Pharmaceutica.* 70, 135–145

Rex DK., Johnson DA., Anderson JC. et al. (2009): American College Of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening..*Am J Gastroenterol.* 104:739-50.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P. (1995): The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavoids, *Free Radical Research.* 22, (4):375-383.

Références Bibliographiques

Riedinger J., Eche N., Basuyau P., Pichon M. (2005): Marqueurs tumoraux des tumeurs solides Cahier de formation Bioforma. (32) Pp: 181.

Rita P., Maria C., Cassatella C., Sara B., Michela S. et al. (2012): Pitfalls of CA19-9, Routine Testing and Comparison of Two Automated Immunoassays in a Reference Oncology Center, American Journal of Clinical Pathology, 138(2): 281-287.

Roberfroid M. (2007) : Prébiotiques : le concept revisité. The Journal of Nutrition , 137(3):830S–837S.

Rosenberg D W., Giardina C. and Tanaka T (2009): Mousemodels for the study of colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 30(2):183–196.

Rosignoli P., Fabiani R., De Bartolomeo A. et al. (2001) : Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. Carcinogenesis. 22(10):1675–1680.

Round JL, Mazmanian SK. (2009): The gut microbiota shapes intestinal immune responses

Rourier P., Laurent-Puig P., Bouche O. (2005): Nouveaux concepts en ancérologie digestive. France : Wolters Kluwer. Pp: 104.

Roux D. (2005): Les nouvelles plantes qui soignent. Ed. S.a.m. Pp: 31.

Rowland IR., Bearne CA., Fischer R., Pool-Zobel BL. (1996): The effect of lactulose on DNA damage induced by DMH in the colon of human flora-associated rats. Nutr Cancer. 26: 37–47.

Ruelland, E., Vaultier, M.-N., Zachowski, A., Hurry, V., 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants, Chapter 2, Elsevier, 49: 35–150

Russo V., Martienssen R., Riggs A. D. (1996): Introduction, Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1-4.

Ryan BM., Lefort F., Mc Manus R., Daly J. et al. (2003): Valeur pronostique de la détection de mutation de l'oncogène KRAS2 dans l'ADN sérique de malades atteints d'un cancer colorectal. Gastroentral Clin Biol. 27: 570-573.

Ryan BM., Robles AI., Harris CC. (2010): Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nat Rev Cancer. 10:389-402.

S

Saema, S., Rahman, L.U., Singh, R., Niranjan, A., Ahmad, I.Z., Misra, P. 2016. Ectopic overexpression of WsSGTL1, a sterol glucosyltransferase gene in Withania

Références Bibliographiques

somnifera, promotes growth, enhances glycowithanolide and provides tolerance to abiotic and biotic stresses. *Plant Cell Rep.* 35 (1): 195–211.

Said O., Khalil K., Fulder S. et Azaizeh H. (2000): Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology.* 83: 251-265.

Samira.B T; Mahfoud.H M; Mohamed.Y, (2015): Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de l'Atriplex halimus L et de l'Haloxylonscopariumpomel du Sahara septentrional. *Annales des Sciences et Technologie.* 7, N° 1.

Samlin-scalzi E., Ychou M. (2009): Marqueurs tumoraux et cancers du tractus gastro-intestinal. *EMC, Gastro-entérologie,* 9-000-E-22,2009.

Samuels Y., Wang Z, Bardelli A., Silliman N. et al. (2004): High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304:554.

Sanchez-Moreno C. (2002): Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International.* 8(3) : 121-137.

Sanchez-Moreno C., Larrauri J A., Saura-calixto F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International.* 8: 121-137.

Sansonetti PJ, Di Santo JP. (2007) : Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity.* 26(2):149-61.

Sansonetti PJ, Medzhitov R.(2009): Learning tolerance while fighting ignorance. *Cell.* 138(3):416-20.

Sansonetti PJ. (2008): Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin*

Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, Collins JK. et al. (2008): Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ Microbiol.* 10(3):789-98.

Schmierer B., Hill CS. (2007): TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:970-82.

Schumacker P T. (2006): Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* 10(3):175-6.

Sengottuvelan M, Nalini N. (2006): Resveratrol, a Phytoalexin Enhances Hepatic Antioxidant Defense in 1, 2-dimethylhydrazine-induced Colon Carcinogenesis. *Int J Pharmacol.* 2(3): 335-40.

Références Bibliographiques

Sevanian A ., Nordenbrand K ., Kim E ., Ernester L ., Hochstein P. (1990): Microsomal lipid peroxidation : The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 .Free Radic Biol Med. 8: 145-152

Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F., (2009): Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. J. Sci. Food. Agric. 89 (4), 555–573.

Shani J., Ahronson Z., Sulman F.G., Mertz W. et al. (1972): Insulin potentiating effect of saltbush (*Atriplex halimus*) ashes. Journal of Medical Sciences, 8 (6): 757-758.

Shetye JD, Rubio CA, Harmenberg U, Ware J. et al. (1990): Tumor-associated antigens common to humans and chemically induced colonic tumors of the rat. Cancer Res. (19): 6358-63.

Shetye JD., Rubio CA., Harmenberg U., Ware J., et al. (1990): Tumorassociated antigens common to humans and chemically induced colonic tumors of the rat. Cancer Res. 50(19): 6358-63.

Shia J., Klimstra DS., Li AR., Qin J., Saltz L., Teruya-Feldstein et al. (2005): Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. Mod Pathol.18:1350-6.

Shirai T., Nakanowatari J., and Kurata Y. (1983): Different doseresponse relationships in the induction of different types of colonic tumors in wistar rats by 1,2-dimethylhydrazine. Gann, The Japanese Journal of Cancer Research. 74: 21-27.

Shivapurkar N., Nikula K. J.,Tanaka T.,Tang Z.C.,Alabaster O. (1997): “Absence of p53 gene mutations in rat colon carcinomas induced through the synergistic interaction between methylazoxymethanol and X-irradiation,” Cancer Letters. 113(1-2):9–16.

Slama K., Boumendjel M., Taibi F. et al. (2020): atriplex halimus aqueous extract abrogates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by modulatingbiochemical and histological changes in rats. archives of physiology and biochemistry, 126(1),49-60

Slama K., boumendjel M., taibi F., boumendjel A., messarah M. (2020): *atriplex halimus* aqueous extract abrogates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by modulatingbiochemical and histological changes in rats. archives of physiology and biochemistry, 126(1),49-60.

Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, et al. (2011): Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. PLoS One. 6(1):e16393.

Références Bibliographiques

Sofowora, A . (2010): Plantes medicinales et medecine traditionnelees d'Afrique . Académie Suisse des sciences naturelles : Karthala, 2010

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, et al. (2008): Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(43):16731-6.

Sonnenberg GF., Artis D. (2012): Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. Immunity. 37: 601–610.

Sopie de Carné T. (2011): Oncogénèse RAS et cancer colorectal : Etude de la réponse au stress oncogénique et de l'échappement à la sénescence. Pp : 17.

Sorial A., Moharib, Abd El Maksoud N. et al. (2014): Anticancer activities of mushroom polysaccharides on chemically induced colorectal cancer in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 4 (07):054-063.

Stagos, D., Amoutzias, G. D., Matakos, A. (2012): Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. Food and Chemical Toxicology. 50: 2155–2170.

Stanley L. (1995): Molecular aspects of chemical carcinogenesis : the roles of oncogenes and tumor suppressor genes. Toxicology. 96 : 173-194.

Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, et al. (2007): Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biol.5(10):2177-89.

Stoffel E M., Boland CR. (2015): Genetics and Genetic Testing in Hereditary Colorectal Cancer. Gastroenterology. 149(5):1191-1203.

Svoboda K.P. & J.B. Hampson. (1999): Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement, SAC Auchincruive, Ayr Scotland, UK, UK., KA65HW.

T

Taft RJ., Pang KC., Mercer TR., Dinger M., Mattick JS. (2010): Non-coding RNAs: regulators of disease. J Pathol. 220:126-39.

Taheri M., Saragovi HU., Stanners CP. (2003): The Adhesion and differentiation-inhibitory activities of the immunoglobulin superfamily member, carcinoembryonic antigen, can be independently blocked. J Biol Chem. 278:14632-14639.

Références Bibliographiques

Takahashi M., Mutoh M., Kawamori T., Sugimura T. et al. (2000): “Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis,” *Carcinogenesis*. 21(7):1319–1327.

Talamali A, Gorenflot R , Haicour R, Henry Y, Dutuit P (2007): Embryogénèse d'*Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae). *Acta Botanica Gallica, Botanique Lettres* 154 : 651-659.

Talukder J .2019. Nutraceuticals in Gastrointestinal Conditions, Springer Nature Switzerland AG in R. C. Gupta et al. (eds.), *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_31

Tamer F.M.D. (2003): Free Radicals, Types, Sources and Damaging Reactions. *Internal Medicine Articles*

Tammariello A E.and Milner J A. (2010): Mouse models for unraveling the importance of diet in colon cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(2):77–88.

Tanaka T: “Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies,” *Journal of Carcinogenesis*. 8(5).

Teo S., Stirling D., Thomas S., Hoberman A., Kiorpes A., Khetani V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. *Toxicology* 179: 183–196.

Theerawitaya C, Samphumphaung T, Cha-um S, Yamada N, Takabe T, 2014. Responses of Nipa palm (*Nypa fruticans*) seedlings, a mangrove species, to salt stress in pot culture. *Flora* 209: 597–603.

Thirabunyanon M., Hongwittayakorn P. (2013): Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Appl Biochem Biotechnol* 2013 Jan;169(2):511-25.

Thomas P., Gangopadhyay A., Steele G Jr. et al. (1995): The effect of transfection of the CEA gene on the metastatic behavior of the human colorectal cancer cell line MIP-101. *Cancer Lett.* 92: 59-66.

Tien MT, Girardin SE, Regnault B, et al. (2006): Antiinflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 176(2):1228-37.

Références Bibliographiques

Torel J., Cillard J., Cillard P. (1986): Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*. 25(2): 383-385.

Touitou Y., Bogdan A. (1988): Etude critique des marqueurs tumoraux récents. *Bull cancer*. 75:247-262

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. (2009): Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*.8(7):579-91.

Trousseau A. (1865): Phlegmasia alba dolens. In : *Medical clinic* . Paris, France : JB Bailliere et Fils 1865; 654-712

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. (2009): A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 457(7228):480-4.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. (2009): The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*.1(6):6ra14.

V

Valko M, Rhodes C J, Moncol J. et al. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1):1-40.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D & Mazur M. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39: 44-48.

Van Acker S., Tromp M., Haenen G. R. M. M. et al. (1995): Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Co*. 214(3) :755-9.

Van Baarlen P, Troost FJ, Van Hemert S, et al. (2009): Differential NF-kappaB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*.106(7):2371-6.

Van Engeland M., Derks S., Smits KM., Meijer GA., Herman JG. (2011): Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *J Clin Onco*.29:1382-91.

Van Engeland M., Derks S., Smits KM., Meijer GA., Herman JG. (2011): Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *J Clin Onco*.29:1382-91.

Vasen HF., Abdirahman M., Brohet R. et al. (2010): One to 2-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. *Gastroenterology*.138:2300-2306.

Vasen HF., Abdirahman M., Brohet R., Langers AM. et al. (2010): One to 2-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. *Gastroenterology*.138:2300-2306.

Références Bibliographiques

Venkateshwarlu E., Swathi G., Sharvana B. et al. (2014): Evaluation of anticancer activity of *Annona muricata* in 1,2 Dimethyl Hydrazine Induced colon cancer. *World Applied Science Journal*. 32 (3): 444-450.

Vilar E., Gruber SB. (2010): Lymphocytic infiltration in stage II microsatellite stable colorectal tumors: A retrospective prognosis biomarker analysis. *Nat Rev Clin Oncol*. 7(3):153-62.

Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J., 2005. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 24: 44–50.

Vogelstein B. , Papadopoulos N., Velculescu V. E. et al. (2013): Cancer genome landscapes. *Science*. 339: 1546-1558.

Vogelstein B. et Kinzler K. W. (1993): The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*. 9 (4):138-141.

W

Wang B.S., Li B.S. & Zeng Q.X. (2008): Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry*. 107: 1198-1204.

Warburg O W F, Negelein E. (1927): the metabolism of tumors in the body. *the Journal of General Physiology*. 8(6):519-530.

Wargovich M. J., Jimenez A, McKee K. et al. (2000): Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* 21(6)1149–1155.

Whitehall VL., Rickman C., Bond CE., Ramsnes I. et al. (2012): Oncogenic PIK3CA mutations in colorectal cancers and polyps. *Int J Cancer*. 131:813-20.

Wollowski I., Rechkemmer G., et al. (2001) : Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer . *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2): 451s–455s

Wolyniec K H, Sue; Haupt, Ygal (2009): P53 and Cell Death. In: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester

Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, et al. (2009): A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 15(9):1016-22.

Références Bibliographiques

Wu W S, Wu J R, Hu C T. (2008): Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species. *Cancer Metastasis Rev.* 27(2):303-14.

Wu W S. (2006): The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25(4):695-705.

X

Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, et al. (2007): Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol.* 5(7):e156.

Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, et al. (2007) : Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol.* 5(7):e156.

Y

Yang, C. S., Li, G., Yang, Z., Guan, F., Chen, A. & Ju, J. (2013): Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols. *Cancer Letters.* 334: 79–85.

Yu H, Pardoll D, Jove R. (2009): STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 9(11):798-809.

Z

Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. (2008): High-throughput diversity and

Zeghib Kh et boutlelis dj.A . (2020): Preventive and Curative Effects of *Atriplex Halimus* L. Aqueous Extract on Benzene Provoked Hepatic Injury in Rats. *Journal of drug delivery and therapeutics.* 10(3). 2020, pp. 217-222.

Zhu RM, Zhang YS. A. (1997): new precancerous lesion of colorectal cancer: aberrant crypt foci. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi*, 1997;5:264-265

Annexes

Annexe N°:01

1. Diagnostic et classification du cancer colorectal :

1.1.Clinique :

Le diagnostic du cancer colorectal repose sur l'apparition de certains signes sont:

➤ **Signes cliniques et biologiques :**

- masse abdominale palpable. anémie ferriprive.

➤ **Signes fonctionnels :**

- Rectorragies, melæna.
- Modification du transit intestinal, syndrome rectal (faux besoins, ténésmes, épreintes).
- Signes fonctionnels non spécifiques (amaigrissement récent inexpliqué, douleurs abdominales inexpliquées).

1.2.Classification et pronostics des cancers colorectaux

La classification ou la stadification est une façon de décrire ou de classer un cancer selon l'étendue de la maladie dans l'organisme. Le système le plus fréquemment utilisé pour le cancer colorectal est la classification TNM de l'Union internationale contre le cancer (UICC). Il existe également d'autres classifications comme la classification Astler – Collé ou Dukes.

1.2.1. La classification TNM

La classification TNM (T, pour la tumeur primitive; N, pour les adénopathies (nodes) et M, pour les métastases) est essentiellement clinique (Tableau 17), adaptée aux contraintes anatomiques topographiques de chaque localisation tumorale. Cette classification prend en compte: de La taille de la tumeur primitive, du nombre de ganglions lymphatiques régionaux qui contiennent des cellules cancéreuses et de leur emplacement et La propagation du cancer, ou métastases, vers une autre partie du corps.

1.2.2. Stadification :

A partir des données de la classification TNM, les cancers du côlon ont été classés en 4 stades (Tableau 18). Les chances de guérison varient considérablement du stade I au stade IV. La stratégie thérapeutique est également adaptée à chacun de ces stades.

Tableau N°17 : Classification AJCC/UICC/TNM des tumeurs du côlon et du rectum (Sobin et al., 2009).

T	Tumeur primitive	N	Adénopathies régionales	M	Métastases à distance
Tx	Tumeur non évaluable	Nx	Adénopathies non précises	Mx	Non précisé
T0	Absence de tumeur sur le prélèvement	N0	Absence d'adénopathies régionales,	M0	Absence de métastases
T1	Atteinte de la sous-muqueuse	N1	Métastase dans 1 à 3 adénopathie(s) régionale(s) N1a métastase dans 1 adénopathie régionale N1b métastase dans 2 ou 3 adénopathies régionales N1c nodule(s) satellite(s) de la sous-séreuse	M1	métastases à distance M1a Métastase limitée à 1 organe M1b Métastases dans plusieurs organes ou péritonéale(s)
Tx	Carcinome <i>in situ</i> : intraépithélial ou invasion de la musculaire muqueuse				
T2	Atteinte de la musculuse	N2	Métastase dans 4 ou plus adénopathies régionales N2a métastase dans 4 à 6 adénopathies régionales N2b métastase dans 7 ou plus adénopathies régionales		
T3	Atteinte de la sous-séreuse, de la séreuse ou de la graisse péricolique	N3	Adénopathies centrales (des troncs vasculaires) métastatiques		
T4	Atteinte de la cavité péritonéale à travers la séreuse ou extension par contiguïté à un organe de voisinage à travers la séreuse. T4a perforation du péritoine viscéral T4b envahissement direct des autres organes ou structures				

Tableau N°18 : Stadification, Classification et Pronostic du CCR (Sobin et al., 2009)

Stade I	T1 N0M0, T2N0M0,	tumeur de petit volume, ou elle a envahi les couches de tissus du côlon ou du rectum, sans qu'elle atteigne les tissus avoisinants c'est-à-dire elle est limitée à l'organe initial, généralement une ablation chirurgicale de la partie touchée du côlon ou du rectum est recommandée à ce stade, permettant la guérison dans 70 à 90% des cas
Stade II	T3 N0M0, T4 N0M0	tumeur localement étendue, elle a traversé la paroi du côlon ou du rectum et a envahi les tissus ou les organes avoisinants, sans toucher les ganglions lymphatiques, pouvant toujours bénéficier d'un traitement locorégional complet et efficace mais comportant un risque d'échec métastatique faisant que les chances de guérison définitive sont voisines de 50 à 60%
Stade III:	quel que soit le T, N1, N2 ou N3, M0,	tumeur locorégionale avancée, étendue aux organes de voisinage, elle propagée à un ou plusieurs ganglions lymphatiques dont le contrôle local n'est pas systématiquement acquis; par ailleurs, risque élevé de métastases, l'ensemble conduisant à une perspective de guérison de l'ordre de 20 à 40%
Stade IV:	quel que soit le T ou le N, M1.	La tumeur s'est propagée à des endroits éloignés, le plus souvent dans le foie, les poumons et les ovaires. Les options de traitement possibles comprennent la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et la thérapie ciblée. A ce stade, il est possible que le cancer ne soit pas guérissable (ce qui permet d'espérer une guérison de l'ordre de 10 à 20% dans la plupart des formes tumorales), mais il peut être maîtrisé. Plus le stade est élevé, plus la maladie est avancée. Le stade de cancer est un élément important afin de déterminer quelles seront les options de traitement.

Annexe N°:02

Tableau 19 : Libellés d'autorisation de mise sur le marché des molécules utilisées dans le traitement des cancers colorectaux métastasés (Sobin et al., 2009)

Chimiothérapie « conventionnelle » (agents cytotoxiques)
<p>Capécitabine (XELODA®) Traitement du cancer colorectal métastatique. En 1^{ère} ligne en association avec l'oxaliplatine ou l'irinotecan ± bévacicumab En 2^e ligne en association avec l'oxaliplatine chez des patients antérieurement traités par l'irinotecan</p>
<p>Irinotecan (CAMPTO®) Cancer colorectal avancé en association avec le 5FU et l'acide folinique chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie antérieure pour le stade avancé de leur maladie. Cancer colorectal avancé en monothérapie après échec d'un traitement ayant comporté du 5FU Cancer colorectal métastatique exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), associé au cétuximab, après échec d'une chimiothérapie à base d'irinotecan. Cancer colorectal métastatique en première ligne en association avec le bévacicumab (et du 5FU/ acide folinique). Cancer colorectal métastatique en 1^{re} ligne associé à la capécitabine ± un agent biologique (bévacizumab)</p>
<p>Oxaliplatine (ELOXATINE®) Cancer colorectal métastatique en association avec le 5FU et l'acide folinique. En 1^{re} ligne en association avec la capécitabine ± bévacicumab. En 2^e ligne en association avec la capécitabine chez des patients antérieurement traités par l'irinotecan</p>
<p>Tégafur, uracile (UFT®) Traitement de 1^{re} ligne du cancer colorectal métastatique. Thérapies ciblées = « Biothérapies »</p>
<p>Bévacicumab (AVASTIN®) Est indiqué dans le cancer colorectal métastatique en combinaison avec une chimiothérapie à base de fluoropyrimidines.</p>
<p>Cétuximab (ERBITUX®) Cancer colorectal métastatique avec gène KRAS de type sauvage exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) : – en association avec une chimiothérapie – en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine et en cas d'intolérance à l'irinotecan Cancer colorectal métastatique en 1^{ère} ligne associé à la capécitabine ± un agent biologique (bévacizumab)</p>
<p>Panitumumab (VECTIBIX®) Le panitumumab est indiqué en monothérapie pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques exprimant l'EGFR et Kras non muté après échec de chimiothérapies à base de fluoropyrimidines, oxaliplatine et irinotecan.</p>

Annexe N°:03

1. Technique de l'induction du cancer colorectale (administration du DMH) :



Annexe N°: 04

2. Technique d'administration de la chimiothérapie



Annexe N°: 05

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Faculté de science de la nature et de la vie

Département de biologie

Questionnaire sur l'*Atriplex halimus*

N° :.....

Date :.....

Commune :.....

Age :.....

Sexe :.....

Niveau académique :.....

Nom vernaculaire :

Nom scientifique :.....

Type de la plante :

Sauvage

Cultivable

Adventice

Usage de la plante :

Thérapeutique

Cosmétique

Autre

Technique de récolte :

Manuel

Mécanique

Moment de la récolte :.....

Utilisation de la plante :

Plante seul

Association possible de plante :.....

Etat de la plante :

Fraiche

desséché

Après traitement

Si desséché méthode de séchage :.....

Partie utilisée :

Tige Fleurs Graine Ecorce
Rhizome Feuilles Plante complété

Forme d'emploi :

Poudre huile essentielle Autre :.....

Mode de préparation :

Infusion Décoction Cataplasme
Cru Cuit Autre :.....

Dose utilisée :

Pincée Poignée Cuillère

Dose précise :

Quantité en g/verre :

Quantité en g/ litre :

Poids du consommateur :

Autre :

Mode d'administration :

Oral Massage Rinçage
Badigeonnage Autre

Posologie (nombre de prise par jours) :

Pour les enfants : 1 fois /jours 2 fois/ jours 3fois / jours

Pour personne âgée : 1 fois /jours 2 fois/ jours 3fois / jours

Pour les adultes : 1 fois /jours 2 fois/ jours 3fois / jours

Durée d'utilisation :

Un jour Une semaine Un mois Jusqu'à la guérison

Méthode de conservation :

A l'abri de la lumière Exposé à la lumière Autres

Utilisation :

- | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|--------------------------|
| Affection dermatologiques | <input type="checkbox"/> | Affection du tube digestif | <input type="checkbox"/> |
| Affection respiratoire | <input type="checkbox"/> | Affection des glandes annexe du tube digestif | <input type="checkbox"/> |
| Affection cardiovasculaire | <input type="checkbox"/> | Affection neurologique | <input type="checkbox"/> |
| Affection genito-urinaires | <input type="checkbox"/> | Affection métabolique | <input type="checkbox"/> |
| Affection ostéo- articulaires | <input type="checkbox"/> | | |
| Cancer | <input type="checkbox"/> | | |

Autre utilisation de la plante :

.....
.....
.....

Effet secondaires :.....

Toxicité :

Précaution d'emploi :.....

Annexe N°: 06

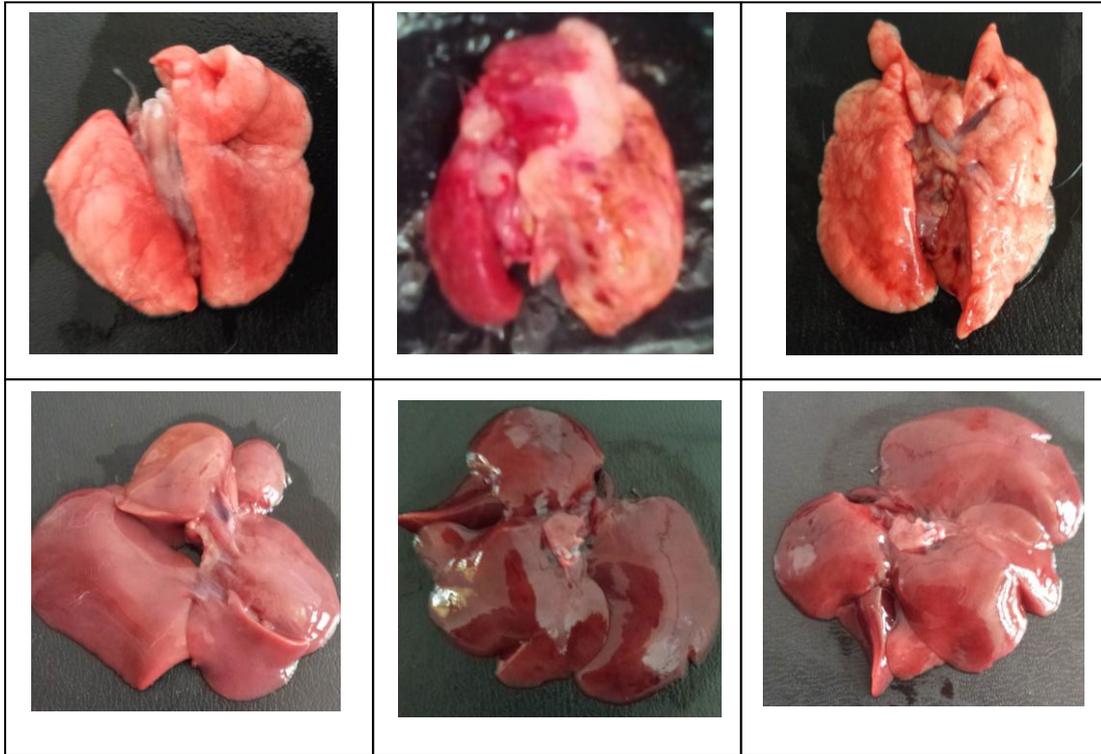


Figure 39 : Photographie des organes prélevés aux rats induit par le DMH

Ethnobotanical and Phytochemical Study of the Medicinal Plant *Atriplex Halimus* and Its Importance in the Traditional Algerian Pharmacopoeia.

Ikram Zennaf^{a*}, Aicha Tir touil^a, Boumediene Meddah^a, Meriem Mokhtar^b

^a *Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety (LBGMSS), Faculty of Nature and Life Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Mascara, Algeria*

^b *Laboratory of Beneficial Microorganisms Functional Food and Health, Faculty of Life and Natural Science, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria*

ikram.zennaf@univ-mascara.dz

Keywords: *Atriplex halimus*, Spontaneous Plant, Ethnobotanical Study, Phytochemical Study, Phytotherapy.

Atriplex halimus, is a medicinal plant widely used in Algerian phytotherapy. This study included an ethnobotanical and phytochemical survey on aqueous extracts (phytochemical screening, HPLC analysis, phenolic content and antioxidant activity). The ethnobotanical study on *A. halimus* showed that aqueous extracts are the most used therapeutic means. The phytochemical study has determined that the phenolic content varies significantly from one extract to another depending on the extraction method. In addition, HPLC analysis has revealed various bioactive compounds that mainly belong to the flavonoid category. *A. halimus* is a valuable source of nutraceutical for various diseases.

Introduction

Algeria's Mediterranean climate conceals an important reservoir of medicinal plants whose virtues have been proved for decades. *A. halimus* is a plant from the phytotherapeutic drawer that has always been used for the treatment of various diseases. In addition to its nutritional value for humans and to its richness in dietary fiber (cellulose) which facilitates digestion, it also contains proteins, vitamins (B and C) and mineral salts (sodium, calcium, potassium, magnesium, phosphorus). This species also has many other assets for human health, such as its hypoglycemic effect by an active ingredient of a

mineral nature: the tissue chromium of this plant would indeed regulate blood glucose by activating the effect of insulin [1]? *A. halimus* also reduces inflammation of the urinary tract and treats lithiasis [2,3]. In addition, its high flavonoid content gives it an important antimicrobial, antifungal effect and an antioxidant, regenerative and cancer-protective activity [3]

Experimental part

Material and methods

Ethnobotanical Study Method

In order to find out the possible use of *A. halimus* in the traditional pharmacopoeia of

Mascara, an ethnobotanical survey among the populations (traditional practitioners, herbalists, healers, shepherds, old people, doctors and pharmacists) was carried out. A total of 200 informants, aged between 20 and 80 years, participated in the study. The survey was carried out by using a form filled in by oral questioning. The questionnaire focused on the information related to the respondents (age, sex and function) and their therapeutic habits (local name, used parts of the plant, therapeutic indications, forms of preparations) and the modes of administration as well as.

The data entered on cards were inserted and processed in Excel[®] spreadsheet software version 2013, allowing us to establish their values in the form of tables and histograms.

Collection, Authentication, and Preparation of Samples

A. halimus was collected in March 2015 in the region of Mascara. The authenticity of the plant species was confirmed by the Mascara Forest Protection Service and the Nature and Life Science Faculty, University of Mascara, Algeria.

According to the ethnobotanical study recommendations, three modes of preparation often used were quoted in the form of aqueous extracts (decocted, infused and macerated). The most used forms were the subject of the phytochemical study. The leaves were dried and reduced to powder. 50 grams of the powdered plant were used in 100 mL of hot water for 20

min. The mixture was filtered, concentrated and freeze-dried, and stored at +4°C until use.

Phytochemical study

Preliminary Phytochemical Screening

The aqueous extracts were subjected to phytochemical screening using standard procedures according to described methods [4,5].

Determination of Total Phenolic Content

The determination of total polyphenols content (TPC) was carried out according to the Folin-Ciocalteu (FC) method [6]: 100 µL of extract mixed with 500 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 400 µL of 7.5% (m/v) Na₂CO₃ solution was added after 5 min. The mixture was stirred and incubated in the dark and at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 760 nm using a UV mini-1240-vis - SHIMADZU. The results were expressed in mg gallic acid equivalent/g of dry extract with reference to the gallic acid calibration curve.

Determination of Total Flavonoid Content

The total flavonoid content (TFC) of the extracts was determined using the aluminum chloride assay previously reported [7]: 500 µL of each extract to be analyzed was added to 1500 µL of 95% methanol, 100 µL of 10% (w/v) AlCl₃, 100 µL of 1 M sodium acetate and 2.8 mL of distilled water. The mixture was stirred and incubated in the dark at room temperature for 30 min. The blank was made by replacing the extract with 95% methanol and the absorbance was measured at 415 nm using a UV mini-1240-vis -

SHIMADZU. The results were expressed in mg quercetin equivalent/g of dry extract with reference to the quercetin calibration curve.

Determination of Condensed Tannins Content

The condensed tannins content (CTC) was determined by the acidic vanillin method described by Ba *et al.* [8]. The vanillin reagent was prepared by mixing 8% (v/v) HCl 37% (v/v) in methanol and 4% vanillin in methanol (m/v) at equal volume. The mixture was maintained at 30°C before the assay. 200 µL of each extract to be analyzed were added to 1000 µL of the vanillin reagent. The mixture was stirred and incubated in the dark at 30°C for 20 min.

The absorbance was measured at 500 nm by using a UV mini-1240-vis -SHIMADZU vs a blank consisting of a mixture of methanol (37%) and HCl (8%) at equal volumes. Results were expressed in mg catechol equivalent /g of dry extract by referring to the calibration curve of catechol.

Determination of DPPH Radical Scavenging Activity

The antioxidant test was performed with the DPPH (2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl) method [9]. 50µL of each methanol solution of extracts at different concentrations (0.0125 to 5 mg/mL) were added to 1.95 mL of the DPPH methanol solution (0.025g/L). The negative control was prepared by mixing 50 µL of methanol with 1.95 mL of the DPPH methanol solution. The absorbance reading was made

against a blank prepared for each concentration at 515 nm after 30 min incubation in the dark and at room temperature. The positive control was a solution of a standard antioxidant, ascorbic acid, whose absorbance was measured under the same conditions as the sample and for each concentration as well. The test was repeated three times. IC₅₀ values were determined graphically by linear fits.

Identification of phenolic compounds in Infusion Extract of A. halimus by HPLC

Qualitative analysis of the polyphenol compounds in the infusion extract was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) on a Prominence-i LC 2030C System with a 15 cm x 4.6 mm, 5 µm Ascentis C18 column (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Two (2) µL were injected into a gradient eluent system of hydro-organic solvents of methanol and acetic acid. The mobile phase was composed of 0.075% acetic acid/water (solvent A) and 0.075% acetic acid/methanol (solvent B) in a linear gradient mode studied, in order to provide a complete resolution of all components in a consistent analysis time: 0 min, 2% B; 5 min, 2% B; 60 min, 50% B; 70 min, 50% B, 71 min, 2% B, under thermostatic control at 30°C, with a flow rate of 0.08 mL/ min, the wavelength range of the chromatograms was 280 nm. The wavelength range of the chromatograms was 280 nm. Data acquisition was performed by the Shimadzu Lab Solution software version

5.10.153 and compared with literature data to identify the nature of the metabolites.

Data Analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and $P \leq 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

The ethnobotanical study

The ethnobotanical studies allow the scientific research on the phytotherapeutic use of plants. The present study on *A. halimus* has enrolled 200 people, 56% of whom were men and 43% women. The age of the people questioned varies between 20 and 78 years old of whom 91% affirm to use the medicinal plants, of whom 65% specify to have used *A. halimus* (different parts).

The convergence of information collected concerning the therapeutic use of *A. halimus* shows its usefulness in the treatment of a range of very varied symptoms grouped in 10 categories of pathology summarized in **Figure 1A**, that translates the importance of the therapeutic use of this plant to solve the problems of primary health and to meet the needs for domestic medicine.

The estimation of the most frequent uses of the plant highlights a massive indication in digestive pathologies with 27%, as well as its wide use against metabolic diseases specifying diabetes with 22.5%, followed by the problems of hydrated cysts with 12%. More interesting is

its use in digestive cancer pathologies with 11.5%.

The predominance of the use of *A. halimus* remains in the affections of the digestive tract. We will try thereafter through certain biological test to elucidate certain effect of this plant.

Phytotherapeutic knowledge is the traditions left behind and perpetuated from generation to generation through customs and oral tradition, in which, knowledge of the properties and uses of medicinal plants are acquired through long-accumulated experience [10, 11, 12]. In the context of our scientific research this knowledge is today the subject of ethnobotanical or ethnomedical studies. They rely on methods of choice for the knowledge of medicinal plants and for their therapeutic use. They allow us to orient ourselves in order to target specific biological tests. Thus, in our study it was essential to begin our research with an ethnobotanical study on our plant *A. halimus*.

Floristic part used

Different parts of the plants are used for the preparation of different therapeutic recipes (leaves, stems, bark, seeds, roots, flowers, etc., **Figure 1B**).

In the case of *A. halimus* the leaves are the most used parts, followed by the stems. The other parts are used with frequencies lower than 10% (**Figure 1B**). Effectively, leaves are mainly used because of their high concentration of active ingredients, since they are the sites of biosynthesis and the storage of secondary metabolites [13].

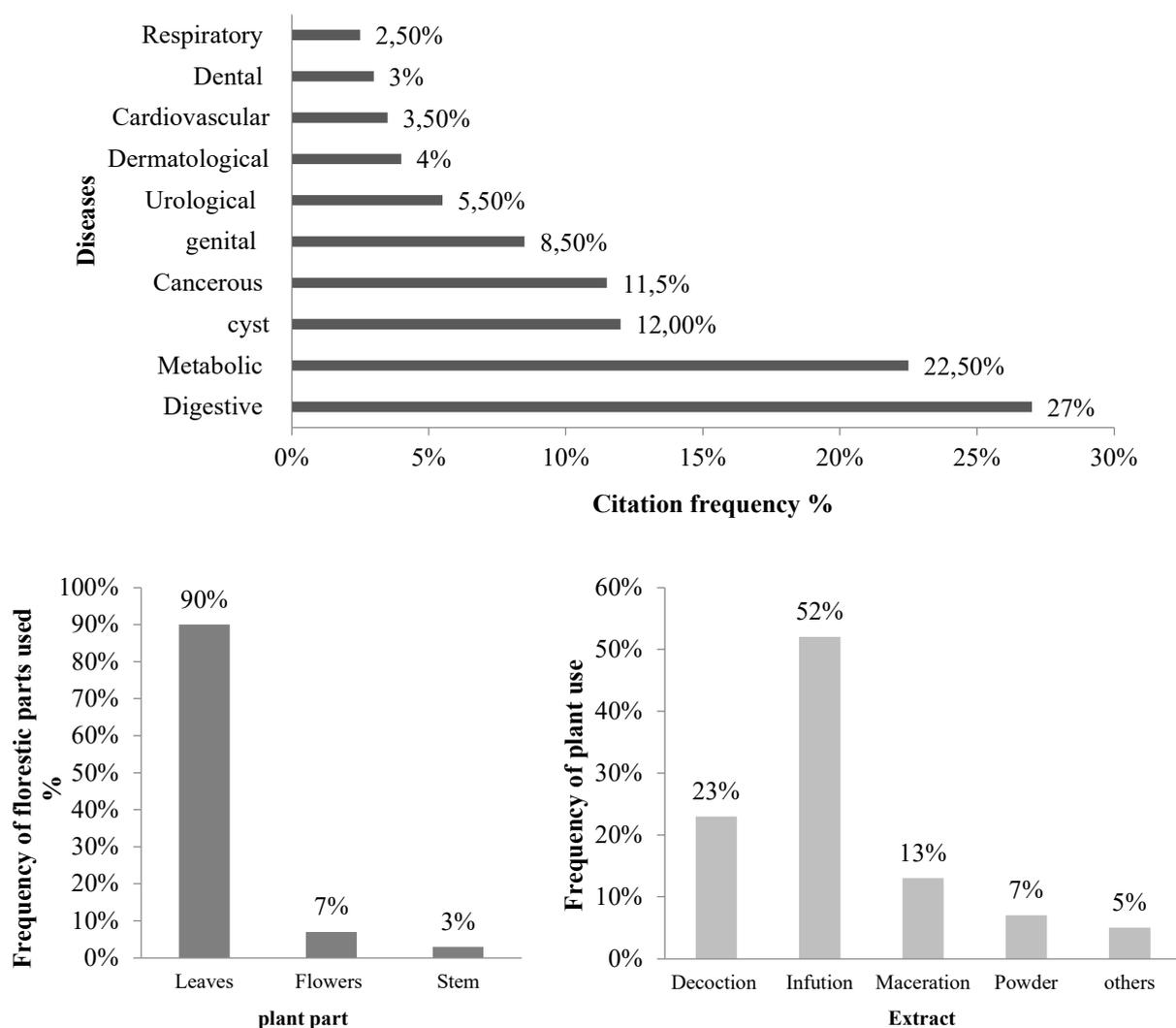


Figure 1. Ethnobotanical study of *A. halimus*: frequency of different diseases treated by the plant (%) (A), frequency of floristic part used (%) (B), frequency of plant use (%) (C)

Mode of preparation

The administration of the active principle of plants uses several modes of preparation, namely in the form of aqueous extracts (decoction, infusion, maceration), or extracts with other solvents (oil, vinegar etc.), powder, etc. Users are always looking for the simplest method to prepare herbal medicines. Infusion is the most common method of preparation. This mode is mainly applied to the delicate organs of the plant such as leaves, flowering tops and

flowers, in order to preserve better the active ingredients [14, 15, 16].

According to our study (**Figure 1C**), the most quoted recipe for the use of *A. halimus* recommends the ingestion of the aqueous infusion of about 10 g of plant powder three times a day for 30 days.

Phytochemical analysis

Extraction yields

According to the ethnobotanical study the most common way of using *A. halimus* was water.

In this context our research will be based on aqueous extraction. The extraction yield of the three methods used, depicted in **Figure 2A**, does not reveal any significant difference ($p>0.05$). However, the infusion seems to be the best extraction method with a yield of 25.8% against 25.1% for decoction, and 24.4% for maceration.

Phytochemical screening

The analyses carried out showed the presence of polyphenols, flavonoids, alkaloids, saponins, terpenoids, and the absence of coumarins in all the extracts. The results are listed in **Table 1**.

Table 1. Phytochemical Constituents of *A. halimus* of Infusion Extract

Secondary Metabolites	Leaves
Polyphénols	++
Tannins	+
Flavonoids	+
Coumarins	-
Alkaloids	+
Terpenoids	+
Saponins	+++

(-) not detectable, (+) low quantities, (++) high quantities, (+++): very high quantities

Total phenolic content of the extracts

Phenolic compounds are highly sought-after bioactive molecules because they are known for their valuable biological properties (antioxidants, antimicrobials, etc.). For these reasons, the crude extracts, obtained by aqueous extraction, were analyzed quantitatively by spectrophotometry for their content in total polyphenols, flavonoids and condensed tannins.

The results of the assay are displayed in **Figure 3**.

Examination of the results showed that the aqueous extracts of *A. halimus* had significantly different levels of total polyphenols in close relation with the extraction method (**Figure 2B**). The infusion had the highest level (12 ± 0.015 mg GAE/g DW) while the macerate had the lowest level (9.5 ± 0.009 mg GAE/g DW).

The results revealed abundance of flavonoids in the extracts (**Figure 2C**). These compounds reached a content of 225 ± 0.05 mg CATE/g DW by the decoction method which gave the richest extracts, as well as 223 ± 0.05 and 224 ± 0.040 mg CATE/g DW for the infused and the macerate, respectively. In addition, the tannin dosage showed significant differences (**Figure 2D**).

The decoction method had the highest content (142 ± 0.11 mg QE/g DW). However, the infusion and macerate methods unveiled low contents with 20 ± 0.007 and 24 ± 0.014 mg QE/g DW, respectively. The variability in the amounts of polyphenol compounds between extracts can be attributed to the extraction method through the used boiling temperature.

Determination of DPPH radical scavenging activity

The antioxidant activity in this study was evaluated by the DPPH scavenging activity (**Table 2**).

Table 2. DPPH Scavenging Activity of *A. halimus*

Extracts	IC ₅₀ (mg/mL)
Decoction	0.29 ± 0.01**
Infusion	0.85 ± 0.02**
Maceration	1.52 ± 0.002**
Ascorbic acid	0.005 ± 0.001

IC₅₀ values are expressed as means ± SEM. The values showed significant differences between the samples and ascorbic acid at P < 0.001.

The results brought to light a moderate antioxidant activity, although less potent than the reference antioxidant ascorbic acid (IC₅₀ = 0.005 ± 0.001 mg/mL), the decoction giving the highest DPPH radical scavenging activity with IC₅₀ = 0.29 ± mg/mL, followed by the infusion extract (IC₅₀ = 0.85 ± 0.02 mg/mL), the lowest activity being that of the maceration extracts (IC₅₀ = 1.52 ± 0.02 mg/mL).

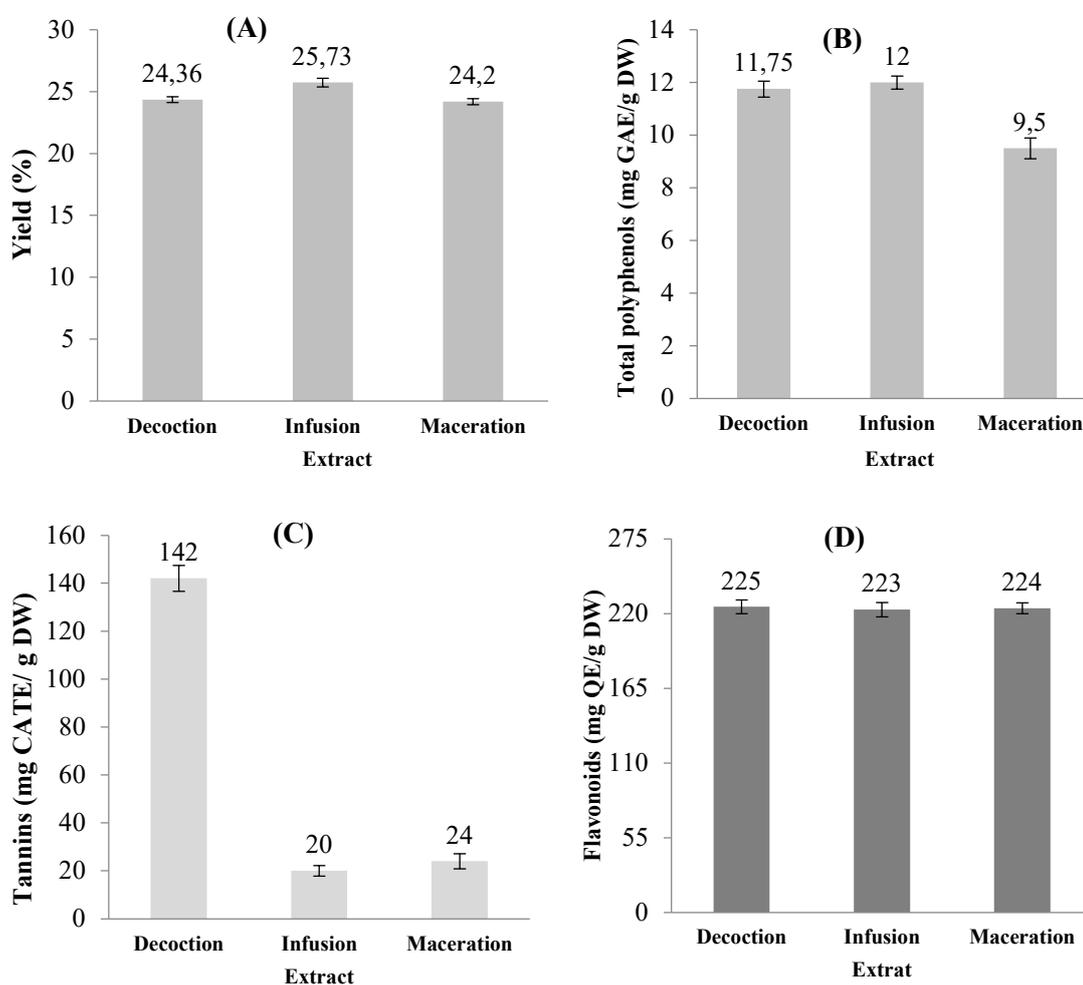


Figure 2. Yield of aqueous extraction (Decoction, Infusion and Maceration) (A), Total polyphenols content (B) expressed on (mg GAE/g DW), Total flavonoids content (C) expressed on (mg QE/g DW) and Tannins content (D) expressed on (mg CATE/g DW)

Identification of phenolic compounds by HPLC

The identification of polyphenolic compounds was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) on a 2030C Prominence-i LC system. The molecules detected are shown in **Figure 3** and **Table 3**.

A total of seven components were identified in the infusion extract of *A. Halimus*: Three phenolic acid (gallic acid, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid) and flavonoids: catechin,

epicatechin, rutin and isorhamnetin-3-O-glucoside.

In fact, the class of flavonoids is in the majority in the extract with important quantities of catechin (717.86 µg/g DM), rutin (360.84 µg/g DM) followed by isorhamnetin-3-O-glucoside (83.33 µg/g DM) and epicatechin (35.12 µg/g DM). On the other hand, among phenolic acids, *p*-coumaric acid presents the most important quantity (59.41 µg/g DM). The other components are minor, with 27.9 and 13.59 µg/g DM for protocatechuic acid and gallic acid, respectively.

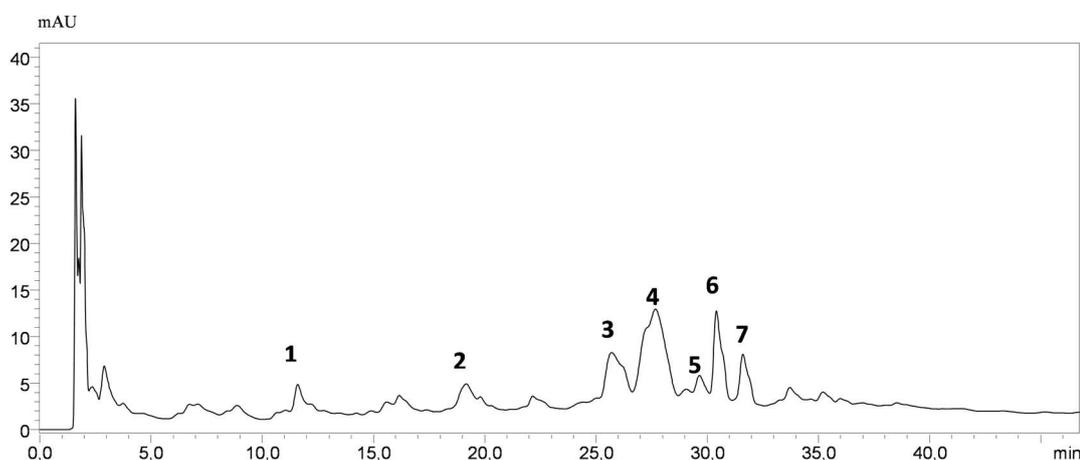


Figure 3. Identification of polyphenols and flavonoids compounds in infusion extracts of *A. halimus*. 1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: *p*-coumaric acid, 4: catechin, 5: epicatechin, 6: rutine, 7: isorhamnetin-3-O-glucoside.

Table 3. Phenolic compounds in *A.halimus* of infusion extract

Peak	Retention Time	λ max	Quantity (µg/g DM)	Compounds
01	11.596	215-270	13.59	Gallic acid
02	19.170	261	27.9	Protocatechuic acid
03	25.709	230-311	59.41	<i>p</i> -Coumaric acid
04	27.678	278-325	717.86	Catechin
05	29.675	252-345	35.12	Epicatechin
06	30.417	255-354	360.84	Rutine
07	31.609	252-353	83.33	Isorhamnetin glycoside

Conclusion

The analysis of the aqueous extracts of the aerial parts of *A. Halimus* has revealed that this species is a potential source of phenolic compounds and has a remarkable antioxidant effect. Hence, it represents a promising phytotherapeutic treatment for different diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Laboratory of Research, Bioconversion, Engineering, Microbiology and Health Safety of the University Mustapha Stambouli Mascara for its technical assistance and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for giving us the opportunity to carry out this research.

References

- [1] Aharonson Z, Shani (Mishkinsky) J, Sulman F. Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a feeding source of the Sand Rat (*Psammomys obesus*). *Diabetologia* 1969;5(6):379-383.
- [2] Belouad A. Medicinal plants from Algeria. ed. Office of University Publications. Alger: 2001; p. 284.
- [3] Emam SS. Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of Natural Products* 2011;4:25-41.
- [4] Njoku V, Obi C. Phytochemical constituents of some selected medicinal plants. *African Journal of Pure and Applied Chemistr* 2009;3(11):228-233.
- [5] Alorkpa EJ, Boadi NO, Badu M, Saah SA. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant properties of assorted *Carica papaya* leaves in Ghana. *Medicinal Plants Journal of Medicinal Plants Studies* 2016;4(6):193-198.
- [6] Boizot N, Charpentier J-P. Rapid method for evaluating the content of phenolic compounds in the organs of a forest tree: INRA. 2006; p. 79-82.
- [7] Seyed Mohammad N, Dehpour A, Ebrahimzadeh M, Seyed Fazel N. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y Aceites* 2009;60(4):405-412.
- [8] Ba K, Tine E, Destain J, Cisse N, Thonart P. Comparative study of phenolic compounds, the antioxidant power of different varieties of Senegalese sorghum and the amyolytic enzymes of their malt. *Biotechnol. Agro. Soc. Environ.* 2010;(14):131-139.
- [9] Sánchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998;76(2):270-276.
- [10] Ndjouondo GP, Ngene JP, Ngoule CC, Kidik Pouka MK, Ndjib RC, Dibong SD, Mpondo E. Inventory and characterization of medicinal plants in the Kambo and Longmayagui sub-watersheds (Douala, Cameroon). *Journal of Animal & Plant Sciences.* 2015;25(3):3898-3916.
- [11] Anyinam C. Ecology and ethnomedicine: Exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Social Science & Medicine* 1995;40(3):321-329.
- [12] Bakiri N, Bezzi M, Khelifi-Slaoui M. Ethnobotanical investigation of a medicinal plant *peganum harmala L.* in the region of M'sila. *Agriculture Journal.* 2016;1:38-42.
- [13] Bahassan A, Zidane L, El Yacoubi H, Rochdi A. Ethnobotanique et taxonomie des plantes médicinales utilisées pour le traitement des pathologies du système digestif à Hadramaout (Yémen). *Phytothérapie* 2014;12(6):399-416.

[14] Ajibesin K, Ekpo B, Bala D, Essien E, Adesanya S. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;115(3):387-408.

[15] Nadembega P, Boussim J, Nikiema J, Poli F, Antognoni F. Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology* 2011;133(2):378-395.

[16] Jdaidi N, Hasnaoui B. Floristic And Ethnobotany Study Of Medicinal Plants In North-West Tunisia: Cas De La Communauté D'ouled Sedra. *Journal of Advanced Research in Science and Technology* 2016;3(1):281-291.

*« Il y'a un chemin secret de la
difficulté au succès »*

Jalâl al-Dîn Rûmî