

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**People's Democratic Republic of Algeria**  
**Ministry of Higher Education and Scientific Research**



**University of Algiers 1 Benyoucef BENKHEDDA**

**Faculté des Sciences**

**Département des Sciences de la nature et de la vie**

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master  
**en Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

Présenté par :

**M<sup>me</sup> CHERIGUENE Eps MOALI Reihana**

## Thème

---

**Rôle de l'extrait brut du romarin dans l'atténuation des  
dommages radio-induits de l'ADN au sein d'une lignée  
cellulaire normale**

---

Devant le jury composé de :

<b>Mme ISSAD</b>	<b>MCB. Université Alger 1</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme LAMARI-NEGACHE</b>	<b>Chercheur Confirmé (CRNA)</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mr OUSMAAL</b>	<b>MCA. Université Alger 1</b>	<b>Co-promoteur</b>
<b>Mme LAMARI</b>	<b>Chercheur Confirmé (CRND)</b>	<b>Examineur</b>
<b>Melle GUERDA</b>	<b>Ingénieur (CRNA)</b>	<b>Invitée</b>

**Année universitaire : 2023-2024**

## *Remerciements*

En préambule de ce mémoire, je tiens à adresser mes profonds remerciements et mes sincères gratitude à toutes les personnes sans lesquelles la réalisation de ce travail n'aurait été possible :

A ma promotrice, Mme **LAMARI-NEGACHE H**, Chercheur Confirmé au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA), Chef de projet de recherche dont j'ai l'honneur de faire partie, j'exprime ma reconnaissance d'avoir accepté de m'encadrer. J'ai eu l'opportunité de bénéficier de son expertise et de ses qualités scientifiques. Sa disponibilité, sa confiance, ses conseils avisés et son soutien constant ont été des éléments clés dans l'aboutissement de ce projet.

A mon Co-promoteur, Mr **OUSMAAL M.**, Maitre de Conférences classe A à l'université d'Alger1 BENYOUCEF BENKHEDDA, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour toutes les remarques pertinentes et les conseils judicieux tout au long de cette période. Je tiens à exprimer ma gratitude pour ses interventions, son accompagnement et son assistance.

A, Monsieur le Directeur General du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger, **GUITTOUM A.**, de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études et de m'inscrire en Master 2.

A la Directrice de Division de la Radiobiologie et de la Dosimétrie des Rayonnements ionisants, Mme **MEZAGUER M.**, pour sa disponibilité, son assistance et ses efforts. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance pour ses interventions et son encouragement continu.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers les membres de Jury, **Mme ISSAD**, Maitre Conférences classe B à l'université d'Alger1 BENYOUCEF BENKHEDDA, de m'avoir fait l'honneur de présider le Jury d'examen, et **Mme LAMARI Z.**, Chercheur Confirmé au Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND) pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier ma collègue Lynda, pour sa contribution qui a joué un rôle déterminant dans la réussite de ce travail.

Je tiens également à remercier mes collègues Sonya et Khadidja pour leurs encouragements et soutien continu.

Je tiens à remercier profondément :  
Mme Aberkane L. Cef de Departement de de La Radiobiologie et Science Du Vivant,  
Mes chers collegues : Yasmina, Meroua, Nesrine, Ahlem, Soumeyya, Khalida, Assia, Sameh, Malika, Ouafek, Djerrad, Bachtobji, Mansouri, Tahtat, pour leur aide et soutien.

A ceux qui ont contribué de près ou de loin, à travers leur soutien moral ou matériel, à la réalisation de ce travail.

## *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail :

A ma mère, la lumière de ma vie, la femme exemplaire que je souhaite être  
A mon père, mon exemple qui m'a montré le bon chemin avec amour

A mon mari qui a cru en moi et qui m'a toujours soutenu,  
A mes petits anges : Maram, Issam et Tesnim,

A mon frère Safouane qui m'a toujours encouragé et soutenu, et sa famille  
A mon frère Houmam qui était toujours disponible pour ses chers, et sa famille  
A ma Sœur Alae le grand cœur qui porte ses chers, et sa famille  
A mon frère Aymen, the talent, thanks for your support

A mes beaux-parents, mon beau-frère Brahim, ma belle-sœur Meriem et sa famille, merci  
pour votre encouragement

À ma grand-mère maternelle, mes oncles et mes tantes.  
A la mémoire de mes grands-parents, mes tantes, qu'ALLAH les accueille dans son vaste  
paradis  
A la mémoire de mon amie et collègue Leila, avec qui j'ai toujours travaillé, tu as laissé un  
grand vide avec douleur, qu'ALLAH t'accueille dans son vaste paradis....

A mes copines : Wassila, Fairouz, Nassima et Razika  
A toute personne qui m'a aidé, ne serait-ce que par un sourire

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien  
infaillible  
Merci d'être toujours là pour moi.

## Résumé

La radiothérapie est la modalité la plus courante de traitement du cancer. L'exposition des organes ou des tissus sains aux rayonnements ionisants pendant le traitement peut entraîner différents effets indésirables. Les tissus normaux doivent être protégés contre les lésions dues aux radiations. Par conséquent, le rôle des composés radio-protecteurs est crucial pour l'optimisation de la radiothérapie

Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle de l'extrait brut des feuilles de romarin *Rosmarinus officinalis*, riche en molécules bioactives, en tant que radioprotecteur sur la lignée cellulaire Vero.

L'activité cytotoxique et le potentiel radio protecteur de l'extrait brut de romarin (EBR) sur les Vero irradiées aux rayonnements gamma ont été évalués par le test colorimétrique MTT. Les tests effectués sur les cellules avec l'EBR ont révélé une absence de cytotoxicité quelque soit la durée d'incubation (24h et 48h). Cela confirme l'innocuité de l'EBR sur la lignée cellulaire Vero. De plus, un traitement combiné associant l'EBR et l'irradiation gamma augmentait significativement la survie cellulaire, en particulier à une concentration de 1 mg/ml. L'analyse de l'apoptose radio-induite par cytométrie en flux, a montré un niveau élevé d'apoptose (81,1%) dans les cellules irradiées non traitées. La présence de l'EBR a significativement diminué le pourcentage d'apoptose détecté dont le pourcentage est de 6,4%. La technique de l'immunofluorescence permet de détecter les dommages à l'ADN, en observant les  $\gamma$ -H2AX liés aux cassures double-brin (CDB). Le traitement préalable avec l'EBR a conduit à des réductions significatives de ces derniers.

Ces résultats indiquent que l'extrait brut de romarin pourrait offrir une perspective thérapeutique prometteuse en tant que radioprotecteur.

**Mots Clefs :** Radiothérapie, *Rosmarinus officinalis*,  $\gamma$ -H2AX, Radioprotecteur.

# Sommaire

<b>Liste des figures .....</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des Abréviations .....</b>	<b>vii</b>
<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Synthèse Bibliographique .....</b>	<b>5</b>
1.1. Les rayonnements ionisants : effet et protection.....	5
1.1.1. Définition .....	5
1.1.2. Effets biologiques et mécanismes d'action des rayonnements ionisants .....	6
1.1.2.1. La radiolyse de la molécule d'eau.....	6
1.1.2.2. Peroxydation des lipides membranaire .....	6
1.1.2.3. Oxydation des protéines .....	7
1.1.2.4. Effet des rayonnements ionisants sur l'ADN .....	7
1.1.2.4.1. Les cassures de l'ADN.....	8
1.1.3. Les défenses naturelles contre les rayonnements ionisants.....	9
1.1.3.1. Réponses cellulaires aux irradiations.....	9
1.1.3.1.1. Dérégulation des voies de signalisation.....	10
1.1.3.1.2. Points de contrôle du cycle cellulaire .....	10
1.1.3.1.3. Réparation des lésions de l'ADN.....	10
1.1.3.1.4. La Mort cellulaire radio-induite.....	11
❖ La nécrose .....	12
❖ L'apoptose.....	12
❖ L'autophagie .....	12
1.1.4. Les techniques de détection des cassures double brin.....	13
1.1.4.1. Techniques directes .....	13
1.1.4.1.1. Test des Comètes.....	13
1.1.4.2 Techniques indirectes .....	14
1.1.4.2.1. Test de micronoyaux.....	14
1.1.4.2.2. Technique d'immunofluorescence (marquage des $\gamma$ -H2AX) .....	14

1.1.4.3. H2A.X et les cassures ‘double brun’ .....	14
1.2. Les agents radioprotecteurs.....	17
1.2.1. Généralités.....	17
1.2.2. Classification des radioprotecteurs.....	18
1.2.3. Les différents radioprotecteurs.....	18
1.2.3.1. Les radioprotecteurs synthétiques.....	18
1.2.3.2. Les radioprotecteurs d'origine naturelle .....	19
1.2.3.3. Les phyto-radioprotecteurs .....	19
1.2.4. Les critères d’un radioprotecteur idéal .....	20
1.2.5. Les différentes voies de radioprotection .....	21
1.2.5.1. Les Mécanismes d’action des radioprotecteurs naturels.....	23
1.3. Le Romarin <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	25
1.3.1. Classification Botanique (Francisco José González, 2020) (Claire Hoefler, 1994) .....	26
1.3.2. Composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L .....	26
1.3.3. Propriétés thérapeutiques du romarin.....	27
<b>2. Matériels &amp; Méthodes .....</b>	<b>30</b>
2.1. Matériels.....	31
2.1.1. Matériel végétal .....	31
2.1.2. Lignée cellulaire .....	31
2.1.3. Equipements, réactifs et milieux de culture .....	32
2.2. Méthodes.....	33
2.2.1. Préparation de l’extrait brut lyophilisé de romarin .....	33
2.2.2. Culture cellulaire .....	34
2.2.2.1. Décongélation des cellules Vero .....	34
2.2.2.2. Entretien et suivis de la culture .....	34
2.2.2.3. Dénombrement des cellules .....	35
2.2.3. Evaluation de la cytotoxicité par le test MTT .....	36
2.2.3.1. Préparation des plaques à 96 puits .....	37
2.2.3.2. Mise en contact de l’extrait brute du Romarin avec les cellules Vero .....	37
2.2.3.3. Le test MTT.....	37
2.2.4. Evaluation de la survie après irradiation gamma par le Test MTT.....	38
2.2.5. Analyse par cytométrie en flux .....	39

2.2.4.1. Mise en contact de l'EBR avec les cellules Vero.....	40
2.2.4.2. Analyse des différents traitements sur l'apoptose des cellules Vero.....	41
2.2.6. Détection des cassures double-brin d'ADN par immunofluorescence .....	43
2.2.6.1. Ensemencement des cellules Vero sur les lamelles .....	43
2.2.6.2. Irradiation des cellules Vero .....	43
2.2.6.3. Marquage des cellules aux anticorps .....	44
2.2.6.3.1. Fixation et lyse.....	44
2.2.6.3.2. Perméabilisation des cellules .....	44
2.2.6.3.3. Immunomarquage avec l'anticorps primaire (Anti- $\gamma$ H2AX).....	44
2.2.6.3.4. Immunomarquage avec l'anticorps secondaire .....	44
2.2.6.3.5. Observation au microscope à fluorescence.....	45
2.2.7. Analyse statistique.....	46
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>48</b>
3.1. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait brut par le test MTT .....	48
3.2. Evaluation du taux de survie des cellules post-irradiation.....	51
3.3. Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux.....	53
3.4. Détection des cassures doubles brin radio-induites par immunofluorescence.....	57
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>71</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>72</b>

## Liste des figures

Figure 1-1 : Différents types des RI et leur pouvoir de pénétration.....	3
Figure 1-2 : les différents types de dommages de l'ADN .....	5
Figure 1-3 : Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN et les mécanismes de réponse cellulaire.....	7
Figure 1.4 : Schéma représentant les différents dommages de l'ADN, les systèmes de réparation et 11.es cibles thérapeutiques potentielles .....	9
Figure 1-5 : Morts cellulaires après exposition aux rayonnements ionisants.....	11
Figure 1-6: structure de l'histone cœur de nucléosome .....	12
Figure 1-7 : Représentation schématique résumant les réponses moléculaires induites suite à une génération de cassures double brin de l'ADN .....	14
Figure 1-8 : Calcul du Facteur de Réduction de Dose. ....	16
Figure 1-9 : Critères pour devenir un radioprotecteur idéal.....	18
Figure 1-10 : Résumé des mécanismes cellulaires des composés naturels ayant des effets radioprotecteurs.....	20
Figure 1-11 : Résumé des mécanismes de radioprotection des produits naturels.....	21
Figure 1-12 : Résumé des mécanismes de radioprotection des plantes .....	22
Figure 1-13 : Rosmarinus officinalis (variété cultivée).....	23
Figure 1-14 : Effets du romarin sur différents types de cancers .....	26
Figure 1-15 : Sources naturelles et activités biologiques de certains polyphénols radioprotecteurs connus et leurs mécanismes d'action possibles .....	27
Figure 2-1 : photographie de la lignée cellulaire Vero au microscope inversé Gx400 .....	29
Figure 2-2 : Les étapes de préparation de l'extrait lyophilisé de romarin.....	30
Figure 2-3 : Les étapes de la décongélation des cellules Vero.....	31
Figure 2-4 : Entretien des cellules Vero, A) observation au microscope inversé B) confluence cellulaire C) transfère des cellules dans des flasque T75 D) incubation des cellules. ....	32
Figure 2-5 : Etapes du dénombrement cellulaire .....	33
Figure 2-6 : Réduction du sel de mono-tetrazolium en formazan par reductase mitochondriale .....	33
Figure 2-7 : Traitement des cellules Vero avec l'EBR .....	34
Figure 2-8 : Test de viabilité MTT .....	35
Figure 2-9 : Schéma récapitulatif des étapes de MTT pour l'évaluation de la survie cellulaire 24h, 48h post-irradiation .....	36
Figure 2-10 : Composants majeurs d'un cytomètre .....	37
Figure 2-11 : Préparation de la suspension cellulaire.....	38
Figure 2-12 : Préparation des Facs pour l'analyse par cyrtométrie en flux .....	39
Figure 2-13 : Photographie du cytomètre en flux (BD FACS Aria) .....	39
Figure 2-14 : Schéma du principe d'immunofluorescence indirecte .....	40
Figure 2-15 : les étapes du marquage des foyers $\gamma$ -H2AX.....	42
Figure 2-16 : Photographie de microscope a fluorescence (Leica DFC x345FX) .....	43
Figure 3-1 : Histogramme montrant le taux de viabilité cellulaire en présence de différentes concentrations de l'EBR à des temps d'incubation de 24h et 48h .....	45
Figure 3-2 : photomicrographie des cellules Vero traitée avec des concentrations de 1-20 mg/ml d'EBR obtenues avec microscope optique à contraste de phase inversée (OLYMPUS K2) Gx400.....	46
Figure 3-3: Représentation graphique des variations des taux de survie cellulaire (%) en fonction du traitement avec l'EBR post-irradiation .....	47
Figure 3-4: photomicrographie des cellules Vero irradiées après un traitement avec des concentrations de 1-20 mg/ml d'EBR obtenue avec microscope optique à contraste de phase	



inversée (OLYMPUS K2) Gx400 .....	48
Figure 3-5: Dot plots multiparamétriques des différentes populations après traitement des cellules à l'EBR, irradiation et EBR + irradiation .....	49
Figure 3-6 : Effets des traitements appliqués sur l'induction de l'apoptose des Vero .....	50
Figure 3-7 : Pourcentage d'apoptose induite par les différents traitements.....	51
Figure 3-8 : Taux d'apoptose induite par les différents traitements.....	52
Figure 3-9 : Micrographie représentant des noyaux colorés au DAPI, mode fluorescent $\gamma$ -H2AX et le Merge des cellules Vero non irradiées et non traitées. Observation au microscope à fluorescence Gx 400 (Leica DFC x345FX).....	53
Figure 3-10 : Micrographie représentant des noyaux colorés au DAPI, en mode fluorescent $\gamma$ -H2AX et le Merge des cellules Vero non traitées et irradiées après 1h, 4h et 24h d'incubation. Observation au microscope à fluorescence Gx400 (Leica DFC x345FX). .....	54
Figure 3-11 : Micrographie représentant des noyaux colorés au DAPI, en mode fluorescent $\gamma$ -H2AX et le Merge des cellules Vero traitées et non irradiées après 1h, 4h et 24h d'incubation. Observation au microscope à fluorescence Gx400 (Leica DFC x345FX). .....	55
Figure 3-12 : Micrographie représentant des noyaux colorés au DAPI, en mode fluorescent $\gamma$ -H2AX et le Merge des cellules Vero traitées et irradiées après 1h, 4h et 24h d'incubation. Observation au microscope à fluorescence Gx400 (Leica DFC x345FX).....	56

## Liste des tableaux

Tableau 1.1: Dommages de l'ADN induits spontanément après une dose de 1 Gray d'irradiation de rayonnements X. ....	6
Tableau 1.2 : Principales molécules bioactives du romarin .....	25
Tableau 2.1 : Caractéristique de la cellule Vero .....	29
Tableau 3.1 : Taux d'apoptose à différents traitements des cellules Vero.....	51

## Liste des Abréviations

- ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- ATM** : Ataxie Téléangiectasie Mutée.
- BER** : Base Excision Repair
- BSA**: Bovine Serum Albumine.
- CDB** : Cassures Double-Brins.
- CRNA** : Centre de Recherches Nnucléaires d'Alger.
- CSB** : Cassures Simple-Brins.
- DAPI**: 4',6'diamidino-2-phenyl-indole.
- DMBA**: 7,12 diméthylbenz(a)anthracène.
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagles Meduim.
- DMSO**: Dimethylsulfovide.
- EBR** : Extrait Brut du Romarin.
- EDTA**: Ethylènediaminetétraacétique.
- FACS** : Tubes spécifique aux cytometre à flux (BD FACS Aria).
- FC** : fragment constant de l'anticorps.
- ERO** : Espèces Réactives d'Oxygène.
- FITC**: Fluorescein isothiocyanate.
- Gr** : Grossissement.
- Gy** : Gray.
- GN** : Gros Noyaux.
- H2AX**: H2A histone family member X.
- IgG** : Immunoglobuline G.
- IP**: Iodure de Propidium
- ISO**: International Organization for Standardization.
- MAPK**: Mitogen-Activated Protein Kinases.
- MB-231**: Human breast cancer cell line.
- MMR**: Mismatch Repair.
- MN**: Micronoyaux.
- mTOR** : Mechanistic Target Of Rapamycin
- MTT**: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
- NCI-H82**: Lung cancer cell line.

**NER:** Nucleotide Excision Repair.  
**NHEJ:** Non Homologue End Joining.  
**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé  
**PARP-1:** poly (ADP-ribose) polymérase 1.  
**PBS:** Phosphosphate Bufferd Saline.  
**PFA:** Paraformaldehyde.  
**pRB :** protéine du Rétinoblastome  
**PSM:** Poste de Sécurité Microbiologique.  
**RI :** Rayonnements Ionisants.  
**RL :** Radicaux Libres.  
**ROS:** Reactive Oxygen Species.  
**RX:** Rayon X.  
**R $\gamma$  :** Rayonnement gamma  
**SM:** Sphingomyéline.  
**SVF :** Sérum de Veau Fœtal.  
**Ser:** Serine.  
**UV:** Ultraviolet.

# **Introduction générale**

# Introduction Générale

Le cancer constitue une menace pour la vie humaine, et il est devenu ces dernières années, l'une des principales causes de décès chez l'homme. Selon *American Cancer Society*, il y a eu 19,3 millions de nouveaux cas de cancer dans le monde en 2020, et 28,4 millions de nouveaux cas sont attendus dans le monde en 2040 (**Sung et al, 2021**). La radiothérapie, constitue l'une des principales modalités utilisées dans la lutte contre les cancers depuis plus de cent ans. Celle-ci est selon le cas associée à la chirurgie et ou à la chimiothérapie (**De Ruyscher et al, 2019 ; Hongyu et al, 2022**).

Les rayonnements ionisants (RI) exercent des effets considérables sur les systèmes biologiques et peuvent agir de façon efficace sur les cellules tumorales. Les techniques de radiothérapie modernes, optimisent le traitement en augmentant la cytotoxicité sur les tumeurs tout en minimisant cet effet sur l'environnement sain. (**De Ruyscher et al, 2019 ; Wang et Tepper, 2021**). Malheureusement, et en raison de la faible sélectivité de la radiothérapie, celle-ci n'est pas sans risque sur le tissu sain environnant, en effet, divers dommages à des degrés différents sur les cellules et les tissus sains ne peuvent être évités (**Azmoonfar et al, 2020**). Les rayonnements ionisants peuvent affecter les cellules par des mécanismes directes ou indirectes, provoquant des changements physiologiques induisant ainsi des pathologies. (**Liu et al, 2023 ; Khurana et al, 2019 ; De Ruyscher et al, 2019**).

La protection des tissus sains contre les RI serait donc une préoccupation essentielle en radiobiologie clinique et environnementale (**Musa et al, 2020**). Un intérêt s'est développé pour l'étude des produits naturels, qui en plus de l'action curative qui a été démontrée, activités anti oxydantes, anti-inflammatoires, réparation des dommages de l'ADN, etc.. Dérivés de plantes, de micro-organismes et de sources marines ces produits sont utilisés depuis longtemps à des fins médicinales et qui pour notre grand bonheur se révèlent être des agents radio protecteurs, ce qui les rend potentiellement intéressants en association avec la radiothérapie. (**ul et al, 2021 ; Parham et al, 2020**).

La plante *Rosmarinus officinalis.L* (romarin) fait partie de la famille des Lamiacées. Elle est largement répandue dans la région méditerranéenne et est distribuée dans de nombreuses autres régions du monde. Ses feuilles sont utilisées comme additifs alimentaires et surtout dans le traitement de nombreux troubles (**Alshahrani et Ibrahim, 2022**). Les principes actifs les plus importants de cette plante comprennent des diterpènes phénoliques et des acides phénoliques, tels que l'acide carnosique, le carnosol, le rosmanol, l'acide ursolique,

l'acide bétulinique et l'acide rosmarinique, qui présentent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales et antibactériennes (**Hassani *et al*, 2016 ; Miraj, 2016**). Le romarin est largement reconnu comme l'une des plantes médicinales ayant l'activité antioxydante la plus élevée d'où ses propriétés de radio protecteur.

C'est dans ce contexte que nous avons évalué le potentiel radioprotecteur de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis.L* sur la lignée cellulaire Vero soumises aux rayons gamma.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons adopté, la démarche expérimentale suivante :

- Tout d'abord on a testé l'innocuité de l'extrait brut du romarin par l'évaluation de la cytotoxicité par le test MTT.
- Puis on a déterminé le taux de survie des cellules post-irradiation par le test MTT.
- Suivit de l'analyse de l'apoptose par cytométrie en flux.
- Enfin, on a procédé à la détection des cassures doubles brin radio-induites par immunofluorescence.

Ce mémoire se déclinera en quatre chapitres organisés de la façon suivante :

Le premier chapitre présentera la recherche bibliographique dédiée à cette étude. Dans la quelle on définit en priorité les rayonnements ionisants, leurs effets biologiques et mécanismes d'action ainsi que la défense cellulaire. On abordera également des techniques de détection des cassures double brin ainsi que les radioprotecteurs, et leurs mécanismes d'action. Ensuite on donne un aperçu de la composition chimique et les effets thérapeutiques de notre plante d'intérêt *Rosmarinus officinalis.L*. Le deuxième chapitre sera consacré aux matériels et méthodes relatant les différents matériels biologiques, ainsi que les équipements et les méthodes expérimentales utilisées. Le troisième chapitre sera, dédié à la présentation des résultats expérimentaux obtenus. Enfin le quatrième chapitre portera sur la discussion générale des résultats.

En derniers, le document se termine par une conclusion sur les points saillants cette recherche suivie d'une liste exhaustive des références bibliographiques utilisées.

# **Premier chapitre : Synthèse Bibliographique**



## 1. Synthèse Bibliographique

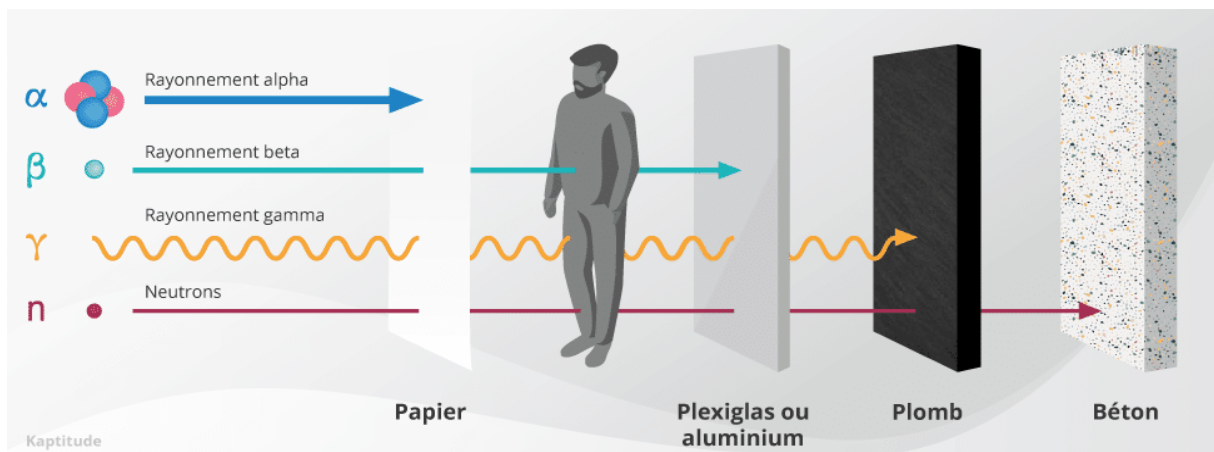
### 1.1. Les rayonnements ionisants : effet et protection

#### 1.1.1. Définition

Les rayonnements sont présents dans notre environnement depuis la genèse de l'Univers. En fait, le rayonnement est l'énergie libérée sous forme de particules ou d'ondes électromagnétiques à partir d'isotopes radioactifs. Il peut être terrestre et cosmique (de l'espace extra-atmosphérique) (**Painuli, 2016**).

On dit qu'un rayonnement est ionisant lorsque l'énergie qu'il peut transférer aux électrons de la matière est suffisante pour les arracher de leur atome (**Leite, 2017**). Les rayonnements ionisants ont la capacité de traverser la matière et leur niveau de pénétrance dépend du type de rayonnement (**Fig 1.1**) (**Tonnessen et Pounds, 2011**).

Il existe deux types de rayonnements ionisants : les rayonnements particulaires  $\alpha$ ,  $\beta$  et les rayonnements électromagnétiques tels que les rayons X et les rayons gamma  $\gamma$  (**Pouthier, 2006**). Les particules  $\alpha$  possèdent un fort pouvoir ionisant, mais elles ne peuvent pas pénétrer le papier (**Dubois, 2017**). Les particules  $\beta$  sont composées d'électrons avec un pouvoir ionisant plus faible et peuvent pénétrer le papier mais pas la barrière cutanée chez l'homme (**Baggenstos et al, 2007**). Cependant, les rayonnements X et  $\gamma$  sont composés de photons et possèdent un pouvoir de pénétrance plus important et un pouvoir ionisant plus faible, ils traversent la barrière cutanée et l'acier (**Dubois, 2017**).



**Figure 1.1** : Différents types des RI et leur pouvoir de pénétration (**Baron, 2022**)

### **1.1.2. Effets biologiques et mécanismes d'action des rayonnements ionisants**

Dans la matière vivante, les atomes sont combinés en molécules (eau, protéines, lipides et acides nucléiques). Ils partagent des électrons pour former des liaisons covalentes. Les rayonnements ionisants, en arrachant des électrons, vont être susceptibles de casser ces liaisons covalentes et donc d'endommager des molécules. Quelle que soit la nature du rayonnement, l'interaction avec les différents constituants cellulaires peut conduire à une lésion directe des molécules contenues dans une cellule eucaryote (lipides, protéines, acides nucléiques de l'ADN nucléaire, mitochondrial et les ARN) **(Freneau, 2018)**.

En effet, les atomes de ces molécules peuvent directement être ionisés ou excités initiant ainsi une cascade d'évènements physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques. De plus, les interactions des rayonnements sur la molécule d'eau, le composant principal de la cellule, conduisent à la production de radicaux libres oxygénés particulièrement agressifs chimiquement. On parlera alors d'effets indirects des rayonnements ionisants **(Freneau, 2018)**.

#### **1.1.2.1. La radiolyse de la molécule d'eau**

La radiolyse de l'eau fait référence au processus de dissociation de la molécule d'eau, sous l'effet d'un rayonnement ionisant. La cellule étant composée à 80 % de molécules d'eau (H<sub>2</sub>O), Cette dissociation ne dure que quelques nanosecondes et entraîne la formation d'espèces radicalaires d'hydrogène et d'hydroxyle, respectivement sous forme de radicaux libres H• et OH•. Le résultat global de la radiolyse de l'eau est donc l'apparition d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO, ROS en anglais). Les ROS interagissent avec un large panel de molécules organiques à savoir les protéines, les lipides et les acides nucléiques **(Le Caër, 2011)**. Les ROS peuvent induire une altération de la fonction biologique des molécules cibles. **(Freneau, 2018)**.

#### **1.1.2.2. Peroxydation des lipides membranaire**

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. L'irradiation est susceptible, par l'intermédiaire des ROS qu'elle génère, d'induire de la peroxydation lipidique des constituants membranaires de la cellule. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur

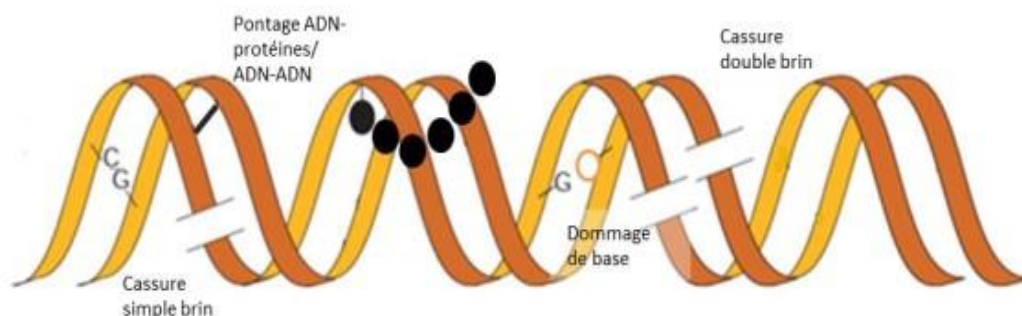
fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...) (**Gutteridge et Halliwell, 1990**).

### 1.1.2.3. Oxydation des protéines

Les rayonnements ionisants peuvent altérer les protéines cellulaires, impliquées dans les voies de signalisation, et dans le bon fonctionnement de la cellule, directement par impact au niveau des chaînes protéiques ou indirectement via les ROS formés par la radiolyse de l'eau (**M. J. Davies, 2003**). Les dommages induits sur les protéines peuvent générer leurs modifications structurales telles que leur fragmentation, leur réarrangement, la modification des acides aminés et la dimérisation par pontages inter- ou intra- protéines ; conduisant à des modifications fonctionnelles telles que la perte d'activité enzymatique, l'altération du processus de protéolyse (**Daly, 2012 ; K. J. Davies, 1987**).

### 1.1.2.4. Effet des rayonnements ionisants sur l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique de tous les êtres vivants. Comme l'ensemble des constituants de la cellule, l'ADN peut être endommagé par les rayonnements ionisants de façon directe ou indirecte (ROS) Les altérations peuvent être la formation de sites abasiques, l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques et celles des sucres, la rupture de brin – simple et double -, l'apparition de liaisons covalentes intra-brins ou entre ADN et protéines adjacentes (pontages ADN-protéines) (**Fig.1.2**). Les différents types de dommages n'ont pas le même impact sur la cellule et ne seront pas reconnus et traités de la même manière (**Freneau, 2018**).



**Figure 1.2 :** les différents types de dommages de l'ADN (**Hoeijmakers, 2001**)

#### 1.1.2.4.1. Les cassures de l'ADN

Les cassures simple-brin (CSB) sont les dommages les plus fréquents dans la cellule (**Tab.1.1**). Elles surviennent au niveau de la liaison phosphodiester (3' ou 5') entre le phosphate et le désoxyribose, souvent à la suite de l'arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par un radical OH (**Evans et al, 2004**). Dans les cellules de mammifères, leur induction n'a pas d'impact direct sur la létalité car leur réparation est très rapide (moins d'une heure) (**Dikomey et al, 1998**).

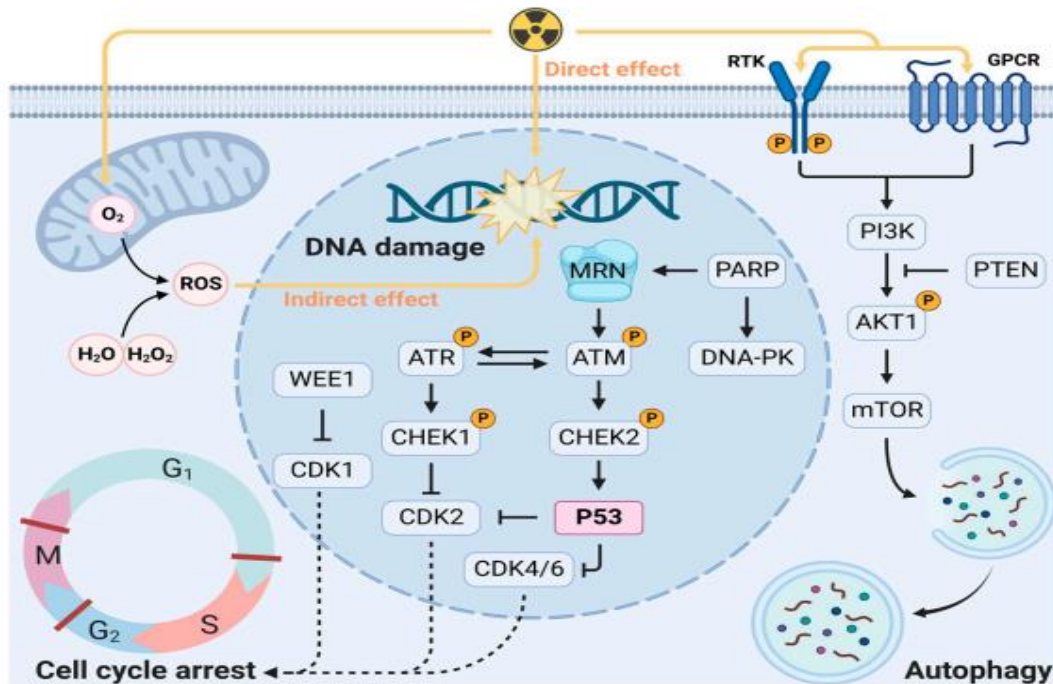
**Tableau 1.1** : Dommages de l'ADN induits spontanément après une dose de 1 Gray d'irradiation de rayonnements X (**Costes et al, 2010 ; Rothkamm et Löbrich, 2003; Stenerlöwet et al, 2003 ; Ward, 1988**).

Types de dommages	Dommages de bases	Pontages ADN-protéines	Pontages ADN-ADN	Cassures simple brin	Cassures double brin
Nombres d'évènements par cellule	950	150	30	1000	40
Système de réparation	Réparation par excision de bases (BER) ou de nucléotides (NER)	Réparation par excision de nucléotides (NER) ou Recombinaison Homologue (HR)	Réparation par excision de nucléotides (NER) ou Recombinaison Homologue (HR)	Réparation par excision de bases (BER)	Recombinaison Homologue (HR) ou Jonction des extrémités non homologues (NHEJ)

Une cassure double brin (CDB) est l'association particulière de 2 CSB se produisant simultanément à une distance de moins de 10 paires de bases, dans un temps court, chacune sur un brin différent de la molécule d'ADN (**Bernhardt et al, 2003 ; Nikjoo, et al 1997**).

La fréquence des CDB va donc fortement dépendre de la distribution spatiale des CSB. Cette association va conduire à la rupture de la molécule d'ADN. Du fait de la rupture de la double hélice de l'ADN, les CDB sont beaucoup plus délétères pour le génome, et les mécanismes de réparation qui en découlent sont spécifiques (**Freneau, 2018**). Des cassures non ou mal réparées peuvent avoir de sévère conséquence sur la survie des cellules et leurs stabilités génomiques (**Bernhardt et al, 2003**).

Lorsque l'ADN est endommagé ; des cassures double-brin se forment. Celles-ci sont toujours suivies de la phosphorylation de l'histone H2AX, formant ainsi des foyers nucléaires  $\gamma$ -H2AX, dont le nombre augmente linéairement avec la gravité du dommage (**Pall et al, 2000**).



**Figure 1.3 :** Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN et les mécanismes de réponse cellulaire

Les rayonnements ionisants peuvent endommager directement ou indirectement l'ADN via les ROS. Les RI activent la réponse aux dommages de l'ADN, entraînant la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et différentes formes de mort cellulaire. Abréviations : AKT1, AKT sérine/thréonine kinase ; ATM, ataxietélangiectasie mutée ; ATR, ataxie-télangiectasie et liés à Rad3 ; CDK, kinase cycline-dépendante ; CHK, kinase de point de contrôle ; DNA-PK, protéine kinase dépendante de l'ADN ; GPCR, récepteur couplé à la protéine G ; Complexe MRN, complexe Mre11-RAD50-Nbs1 ; mTOR, cible mammifère de la rapamycine ; PARP, poly(ADP-ribose)-polymérase ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PTEN, homologue de phosphatase et de tensine ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; RTK, récepteur tyrosine kinase ; WEE1, protéine kinase de type Wee1 (Zhang Yi *et al*, 2023).

### 1.1.3. Les défenses naturelles contre les rayonnements ionisants

#### 1.1.3.1. Réponses cellulaires aux irradiations

Les radiations ionisantes engendrent une grande diversité de lésions dans l'ensemble des compartiments subcellulaires, celles qui affectent l'ADN étant les plus importantes. La réponse des cellules à ces dommages se traduit par : l'apparition d'un stress oxydatif et une chute du potentiel redox mitochondrial ; l'activation des voies de signalisation modifiant l'expression des gènes ou la phosphorylation d'un grand nombre de protéines ; une altération du cycle cellulaire ; des mutations et des aberrations chromosomiques, souvent une aneuploïdie ; une modification du phénotype ; la mort cellulaire (mort clonogénique) ou perte de la capacité proliférative, qui constitue l'effet recherché pour la stérilisation des tumeurs en radiothérapie (Huguet, 2010).

#### 1.1.3.1.1. Dérégulation des voies de signalisation

L'exposition des cellules à une irradiation provoque l'activation compensatoire et spécifique de nombreuses voies de signalisations intracellulaires, jouant un rôle primordial dans le contrôle de la survie cellulaire (**Dent et al, 2003 ; Valerie et al, 2007**). Certaines de ces voies sont activées par des facteurs mitogènes (la voie EGFR/RAS/PI3K-MAPK) tandis que d'autres le sont par les récepteurs de mort (la voie dépendante de NFκB). Ainsi, l'expression des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille ErbB (EGFR, ...) est stimulée en réponse à l'irradiation (**Amorino et al, 2002 ; Balaban et al, 1996 ; Goldkorn et al, 1997 ; Kavanagh et al, 1998 ; Kavanagh et al, 1995**). Ces récepteurs sont capables de moduler les principales voies de transduction du signal dont la dérégulation intervient dans la mise en jeu des différentes réponses à la présence de dommages radio-induits : blocages de cycle, mise en jeu des systèmes de réparation de l'ADN, mort cellulaire radio-induite, etc. Il est intéressant de noter que les inhibiteurs des récepteurs ErbB et d'autres récepteurs aux facteurs de croissance peuvent entraîner des modifications de la croissance et de la survie cellulaire après irradiation (**Bourhis et al, 2007 ; Chen et Nirodi, 2007 ; Dent et al, 2003**).

#### 1.1.3.1.2. Points de contrôle du cycle cellulaire

Afin d'assurer une répllication conforme du matériel génétique et de promouvoir la survie, le cycle cellulaire comporte plusieurs points de contrôle (checkpoints). Ces derniers revêtent une importance biologique fondamentale, comme l'atteste leur conservation au cours de l'évolution (**Zhou et Elledge, 2000**). De plus, leur défaillance provoque l'accumulation de diverses anomalies (mutations, aberrations chromosomiques). L'induction de cassures simples ou double brin de l'ADN, ou des changements de conformation de la chromatine, sont des signaux susceptibles d'activer ces points de contrôle (**Iliakis et al, 2003**).

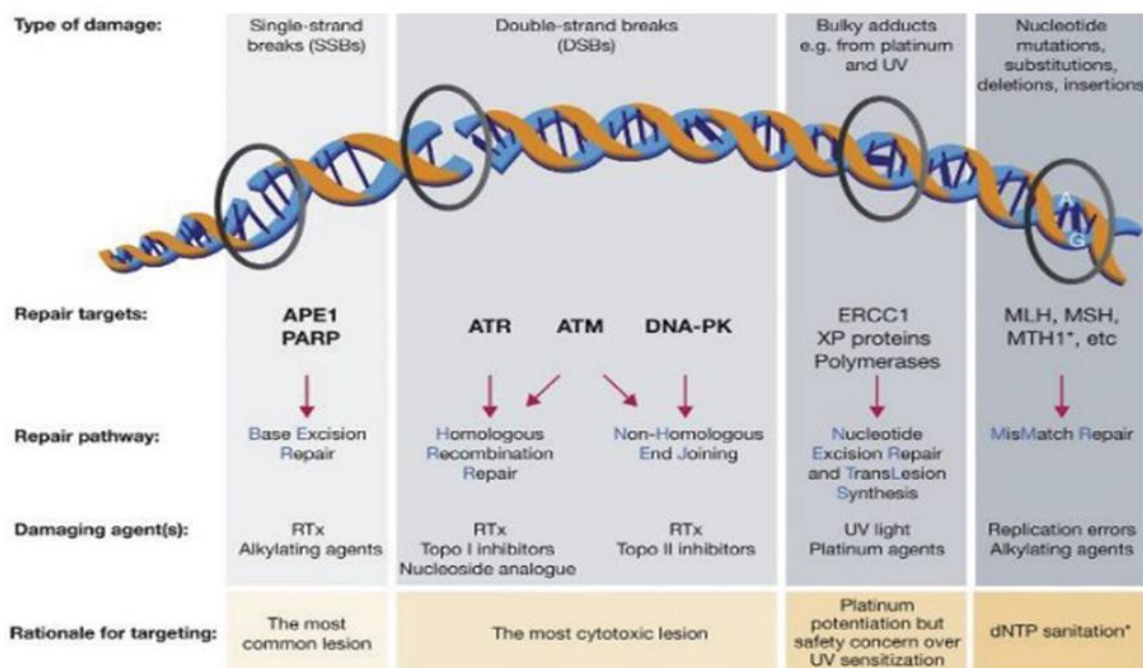
#### 1.1.3.1.3. Réparation des lésions de l'ADN

La cellule eucaryote a développé au cours de l'évolution des mécanismes de réparation spécifiques de chaque type de lésion de l'ADN (**Fig.1.4**). Les principaux mécanismes de réparation sont au nombre de cinq :

- Réparation par excision de base (Base Excision Repair, BER),
- Réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair, NER),
- Réparation des mésappariements de bases (Mismatch Repair),
- Réparation des CDB par suture non-homologue (Non Homologous End-Joining, NHEJ),

- Réparation des CDB par recombinaison homologue (RH).

La réparation permise par ces différents mécanismes peut être fidèle, c'est-à dire qu'elle restaure parfaitement la séquence d'ADN originelle, soit infidèle, c'est-à dire qu'une partie de la séquence nucléotidique aura perdu une partie de son information, ou que la nouvelle séquence synthétisée diffèrera de la séquence avant lésion. Il faut noter que plusieurs syndromes de prédisposition aux cancers sont liés à la perte de fonction ou à la délétion de gènes de réparation. Ces défauts de réparation sont également responsables de réactions <sup>2</sup> aiguës d'hypersensibilité aux RI.



**Figure 1.4 :** Schéma représentant les différents dommages de l'ADN, les systèmes de réparation et les cibles thérapeutiques potentielles (O'Connor, 2015).

**APE1** (AP endonuclease 1); **ATM** (Ataxia-Telangiectasia Mutated); **ATR** (Ataxia-Telangiectasy and Rad3 related); **DNA-PK** (DNA-dependent protein kinase); **PARP** (poly ADP-ribose polymerase); **RTx** (radiothérapie); **Topo** (topoisomérase).

#### 1.1.3.1.4. La Mort cellulaire radio-induite

En réponse aux rayonnements ionisants, l'ADN lésé peut soit être réparé par les différents systèmes de réparation décrits précédemment, soit conduire à une réparation fautive associée à une survie cellulaire et des mutations sans conséquence (à cause de la diploïdie, du caractère non codant de la majorité de l'ADN, de la différenciation cellulaire), soit conserver des anomalies qui conduisent à un état intermédiaire de catastrophe mitotique et des mécanismes de mort cellulaire tels que la mort immédiate, l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (**Fig.1.5**) (**Kroemer et al, 2009**).

❖ La nécrose

La nécrose est une mort cellulaire « passive et désordonnée ». La nécrose se produit dans des cas de stress sévère comme le sont les ischémies, l'absorption de doses massives de molécules toxiques et les dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes. Elle s'accompagne de la rupture des membranes cellulaires ainsi que celles des organelles. Cette « explosion cellulaire » conduit au relargage du contenu cytoplasmique dans le compartiment intercellulaire, ce qui a pour effet d'endommager les cellules voisines et de provoquer d'importantes réactions inflammatoires (**Golstein et Kroemer, 2007**).

❖ L'apoptose

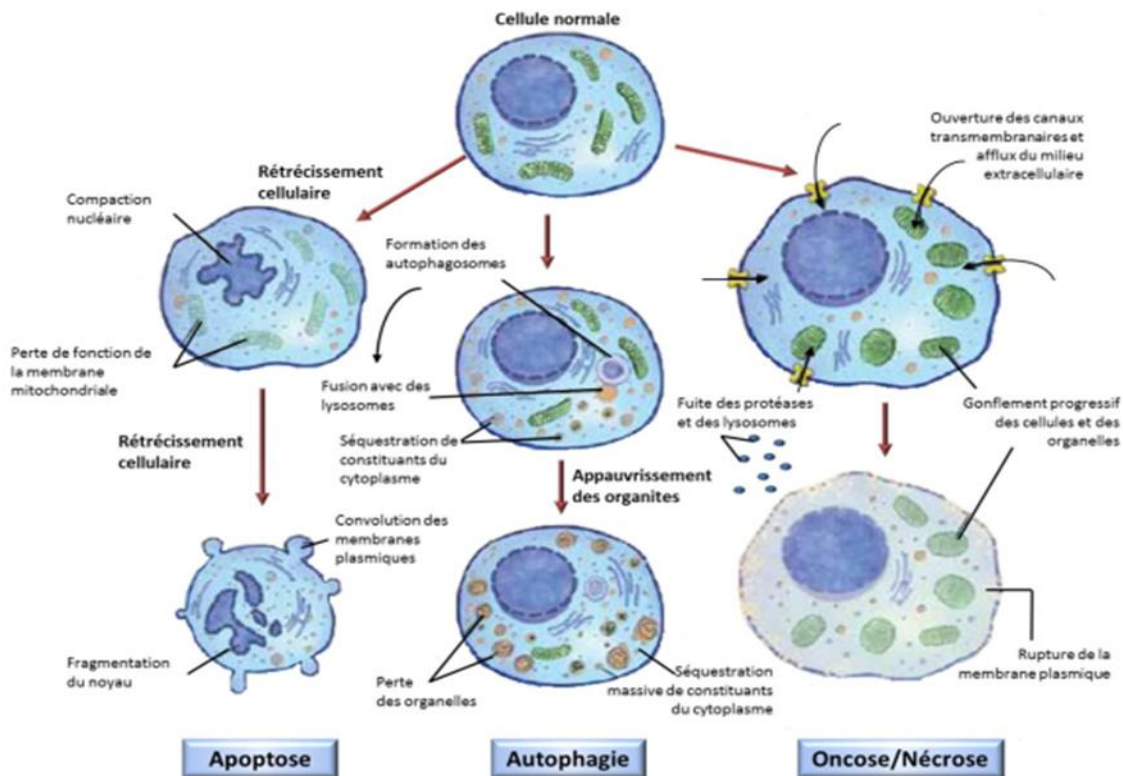
L'apoptose ou « mort cellulaire programmée » est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Elle est aussi responsable de l'élimination de cellules à l'âge adulte, et notamment de cellules dont l'ADN est endommagé, pour maintenir l'intégrité génomique et l'homéostasie cellulaire (**Conradt, 2009**).

L'apoptose se caractérise par un arrondissement de la cellule, une rétractation des pseudopodes, un abaissement du volume cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une phagocytose des cellules apoptotiques (**G Kroemer et al, 2009**).

❖ L'autophagie

Ce type de mort cellulaire consiste en une digestion d'une partie du contenu de la cellule par ses propres lysosomes. Au cours duquel les protéines et les organites sont séquestrés dans des vacuoles, appelées autophagosomes, fusionnés avec les lysosomes puis dégradés et recyclés afin de maintenir le métabolisme de la cellule (**Eskelinen, 2005**).





**Figure 1.5 :** Morts cellulaires après exposition aux rayonnements ionisants.

Représentation simplifiée de trois morts cellulaires : l'apoptose, l'autophagie et l'oncose/nécrose. Dans le processus de mort apoptotique, des corps sont formés et les membranes peuvent être dégradées avec libération du contenu dans le milieu extracellulaire (nécrose apoptotique). Dans le processus d'autophagie, la cellule libère des lysosomes qui seront, au sein d'un organisme entier, phagocytés. L'oncose/nécrose, se traduit par un gonflement général des organites de la cellule, elle se finit en nécrose lorsque la membrane plasmique est lysée et libère son contenu dans le milieu extracellulaire. Adaptée de (Hotchkiss, Strasser, McDunn, & Swanson, 2009).

## 1.1.4. Les techniques de détection des cassures double brin

### 1.1.4.1. Techniques directes

#### 1.1.4.1.1. Test des Comètes

Le test des Comètes ou « Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Assay » en conditions alcalines, est défini comme une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible, qui permet d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les cassures d'ADN simple et double-brin et les sites alcali-labiles sur des cellules eucaryotes individualisées (McKelvey-Martin *et al*, 1993 ; Zennouche, 2005).

### 1.1.4.2 Techniques indirectes

#### 1.1.4.2.1. Test de micronoyaux

Les micronoyaux sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal, provenant de la perte de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers pendant la division nucléaire, conséquences respectivement d'effets clastogènes (cassures double brin de la molécule d'ADN) ou d'effets aneugènes (altérations de l'appareil mitotique liés principalement à des interactions avec les protéines). Le test des MN est le plus souvent réalisé sur des lymphocytes sanguins, les dommages à l'ADN pourraient y être moins fréquemment observés que dans les cellules cibles d'un agent génotoxique potentiellement cancérogène (Pham, 2011).

#### 1.1.4.2.2. Technique d'immunofluorescence (marquage des $\gamma$ -H2AX)

L'immunofluorescence H2AX a révolutionné l'évaluation des CDB en permettant la mesure de leurs nombres in situ (dans chaque noyau). La phosphorylation fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des CDB. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (pH2AX), montre la présence de nombreux foci dans le noyau des cellules irradiées. Il existe une étroite corrélation entre le nombre de foci pH2AX et le nombre de CDB induites après irradiation (Rogakou, Boon *et al*, 1999 ; Rothkamm et Lobrich, 2003).

#### 1.1.4.3. H2A.X et les cassures 'double brun'

L'histone H2A.X, une isoforme de l'histone H2A, représente 2 à 25 % du taux d'expression relatif de la protéine H2A, en fonction du type cellulaire ou tissulaire étudié. Elle est distribuée de façon homogène sur la chromatine (Rogakou *et al*, 1998). Cette protéine est impliquée dans la reconnaissance des cassures double brin ainsi générées et permet le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN aux sites de ces derniers.

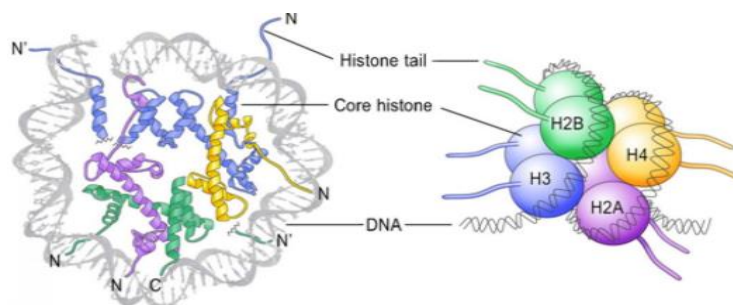


Figure 1.6 : Structure de l'histone cœur de nucléosome (Ridgway, 2006)

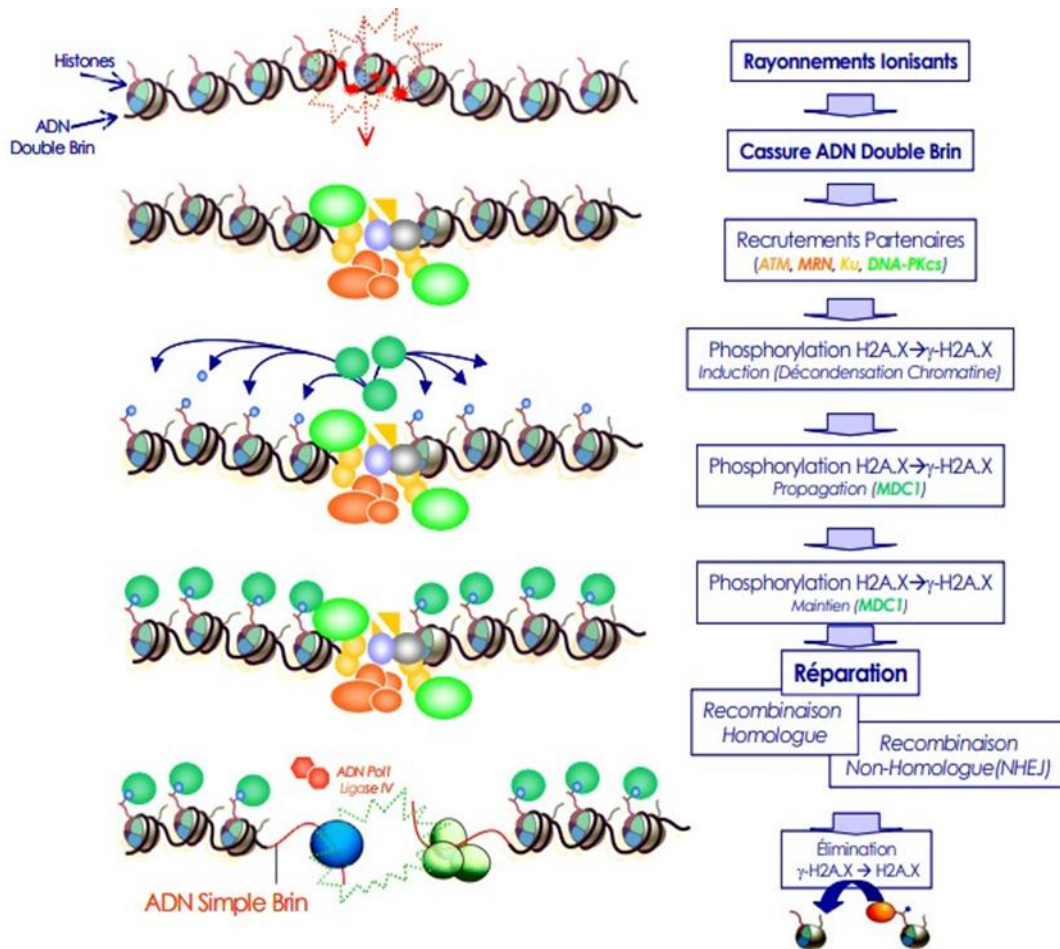
Les cassures ‘double brin’ radio-induites sont décelées par des protéines détectrices (MRE11 par exemple) qui reconnaissent également les modifications de la chromatine associées à l’induction des cassures. Ces protéines activent des protéines de transmission ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) et DNA-PK (protéine kinase dépendante de l’ADN) qui à leur tour vont activer par phosphorylation les protéines effectrices. Ces protéines déterminent l’arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l’ADN ou le déclenchement de la mort cellulaire.

Bien que les trois kinases (DNA-PK, ATM et ATR) soient capables de phosphoryler H2AX, elles pourraient intervenir dans des réponses cellulaires différentes. La kinase ATM serait responsable de la phosphorylation de H2AX en réponse aux cassures doubles brins causées par des radiations ionisantes (**Burma *et al*, 2001**)

La réparation des cassures ‘double brin’ peut se faire soit par recombinaison homologue soit par recombinaison non homologue

La phosphorylation peut être mise en évidence à l’aide de l’anticorps spécifique, faisant apparaître la cassure double brin sous forme de spots fluorescents appelés foci  $\gamma$ -H2AX.

D’autres marqueurs moléculaire précoces comme MRE11, pATM, ATR peuvent être éventuellement utilisés pour compléter l’analyse des dommages radio-induites (**Montarou *et al*, 2010**).



**Figure 1.7 :** Représentation schématique résumant les réponses moléculaires induites suite à une génération de cassures double brin de l'ADN (Downs et Jackson, 2003).

Les cassures double brin de l'ADN sont générées par des rayonnements ionisants. Les lésions détectées, un grand nombre de kinases sont activé (ATM, ATR et DNA-PK) et l'histone H2AX est phosphorylée. Cette phosphorylation a pour effet le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation et la signalisation des dommages. Enfin, d'autres facteurs peuvent intervenir afin d'augmenter l'efficacité de réparation et de prévenir les réparations inefficaces.

## 1.2. Les agents radioprotecteurs

### 1.2.1. Généralités

Au cours des dernières décennies, de nombreux composés naturels et synthétiques ont été étudiés pour leur potentiel en tant que radioprotecteurs.

Un radioprotecteur est une substance qui permet, si elle est administrée avant irradiation, de réduire et/ou d'atténuer les effets causés par une exposition à un rayonnement ionisant. **(Jicong et al, 2020)**. L'effet radioprotecteur de certains composés contre les effets délétères des rayonnements ionisants a été publié pour la première fois par W.M. Dale en 1949. Un nouveau composé, le CBLB-502, a récemment été publié. Il présenterait une activité radioprotectrice comparable, ou légèrement supérieure au composé de référence, le WR-2721 **(Damien Cressier, 2010)** L'usage de tels composés peut avoir lieu dans le domaine médical lors de radiothérapies ou lors d'une exposition prévisible ou accidentelle. Dans le cas d'une exposition accidentelle, l'utilisation de tels composés devient complexe car de nombreuses données sont inconnues telles que la dose, la distribution de la dose, le stress etc **(Damien Cressier, 2010)** Dans un contexte clinique tel que la radiothérapie, un radioprotecteur est utilisé pour accroître l'efficacité du traitement du cancer. L'agent protecteur doit agir contre les dommages causés par les radiations de manière sélective dans les cellules saines, tout en augmentant les dommages causés par les radiations sur les cellules cancéreuses. En radiothérapie, les composés d'origine végétale offrent une solution plus fiable que les composés synthétiques, car ils sont moins toxiques, possèdent une activité phytochimique synergique et sont moins coûteux et respectueux de l'environnement. Les composés phytochimiques possédant à la fois des propriétés radioprotectrices et anticancéreuses peuvent multiplier par deux l'efficacité du traitement. Les agents radioprotecteurs à base de plantes constituent donc un domaine prometteur pour progresser et repousser les limites de la radioprotection **(Jivendra et al, 2022)** Contrairement aux radiomitigateurs, les radioprotecteurs sont administrés avant ou au moment de l'exposition aux rayonnements **(Shakyawar et al ,2023 ; Kamran et al, 2016)**

Leur effet protecteur se manifeste par une lésion moins importante lors de l'irradiation des tissus radiosensibles et par une récupération plus rapide après l'irradiation, ce qui entraîne généralement une diminution de la gravité des lésions dues à l'irradiation. L'utilisation de radioprotecteurs après une irradiation est généralement inefficace **(Aliper et al, 2020)**.

### 1.2.2. Classification des radioprotecteurs

Depuis la découverte des propriétés radioprotectrices de la cystéine, de la cystéamine et du WR-2721, de nombreuses études ont eu pour but de trouver le meilleur radioprotecteur. Ainsi, il a été nécessaire de déterminer un moyen de classification de ces composés. L'efficacité d'un radioprotecteur in vivo a ainsi été définie par son Facteur de Réduction de Dose (FRD) correspondant au rapport des doses d'irradiation qui provoquent 50% de mortalité à 30 jours, respectivement chez les animaux protégés et chez les animaux non protégés (**Fig.1.8**). Chacune de ces doses d'irradiation est déterminée préalablement.

$$\text{FRD} = \frac{\text{DL}_{50/30\text{jours}} \text{ chez les animaux protégés}}{\text{DL}_{50/30\text{jours}} \text{ chez les animaux non protégés}}$$

**Figure 1.8** : Calcul du Facteur de Réduction de Dose.

Ce FRD doit être supérieur à 1,2 pour envisager un usage médical et supérieur à 2 pour un usage militaire (**Damien Cressier, 2010**).

### 1.2.3. Les différents radioprotecteurs

#### 1.2.3.1. Les radioprotecteurs synthétiques

Pour les toutes premières recherches in vivo sur les radioprotecteurs potentiels, il y a plus d'un demi-siècle, l'acide aminé cystéine, qui contient un groupe SH, a été utilisé. À partir de 1957, lorsque l'armée américaine a commencé à développer des agents radioprotecteurs, dans la communauté des chercheurs connus sous le nom de protecteurs WR (WR, facteur de pondération du rayonnement), plus de 4 400 composés avec un groupe aminothiols ont été synthétisés. Les agents WR diffèrent structurellement par la longueur des groupes aminoalkyles, par la présence ou l'absence de groupe Me à l'extrémité, et/ou par la présence d'un groupe OH sur la chaîne alkyle. Le composé le plus important de cette classe est l'amifostine (**Kuntic et al, 2013**).

L'amifostine (WR-2721) est un promédicament de thiophosphate organique, analogue de la cystéamine. Chimiquement, il s'agit d'un ester de thiol et d'acide phosphorique, appelé 2-[(3aminopropyl)amino]éthanethioldihydrogénophosphate (aminopropylaminoéthylthiophosphate). La radioprotection de l'amifostine est réalisée par déphosphorylation par l'enzyme phosphatase alcaline pour former un thiol libre qui représente

son métabolite actif appelé WR-1065. En raison de la teneur beaucoup plus élevée en phosphatase alcaline dans une cellule saine que dans une cellule tumorale et des valeurs de pH plus élevées, le WR-1065 s'accumule dans les cellules saines, ce qui rend sa concentration plusieurs centaines de fois plus élevée. Le WR-1065 protège les cellules saines principalement en neutralisant et en éliminant les ROS, et contribue également à la récupération de l'ADN endommagé en donnant de l'hydrogène. L'amifostine est le seul radioprotecteur approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour une utilisation en médecine humaine (**Kuntic *et al*, 2013**).

### **1.2.3.2. Les radioprotecteurs d'origine naturelle**

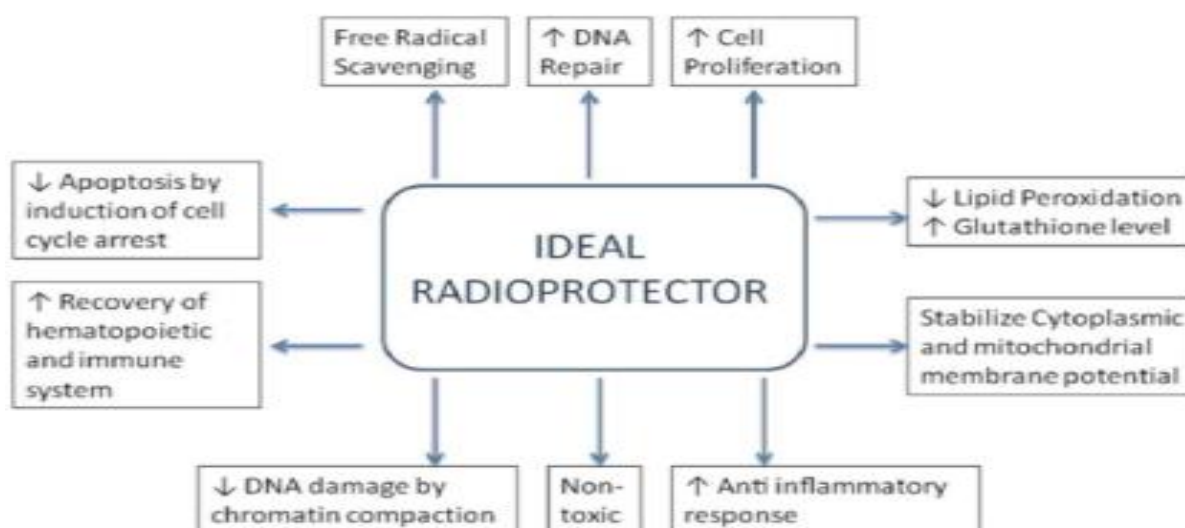
La famille des radioprotecteurs naturels est constituée des différents composés extraits des plantes, algues et champignons ainsi que des vitamines, des caroténoïdes, des polyphénols, des polysaccharides, des acides aminés, des lipides, des amines et polyamines, des hormones, protéines et peptides... D'après des études menées par (**Venkatachalam *et al*, 2008**), les composés naturels auraient pour la majeure partie une action spécifique sur un organe donné. Ainsi, par exemple, alors que le système hématopoïétique est très bien protégé par la vitamine E, la vincristine ou l'acide lipoïque, le système nerveux est protégé par la vitamine C et le mannitol. De même, la réparation de l'ADN est favorisée par la mélatonine, l'huile d'olive ou la nicotamide. L'utilisation de produits naturels tels que les vitamines, les acides aminés, les lipides, les amines et polyamines, les hormones, ou les protéines et peptides est intéressante car ces composés présentent en général une toxicité très faible et sont bien tolérés par l'organisme (**Damien Cressier, 2010 ; Kuntic *et al*, 2013**).

### **1.2.3.3. Les phyto-radioprotecteurs**

Au cours des 30 dernières années, l'attention s'est considérablement déplacée vers l'évaluation des produits végétaux en tant que radioprotecteurs. Ce changement est principalement dû à l'efficacité de leur protection contre les radiations, associée à leur faible toxicité. On pense que les extraits de plantes possèdent des propriétés radioprotectrices parce qu'ils contiennent de nombreux composants actifs, tels que des antioxydants, des immunostimulants et des composés ayant une activité antimicrobienne (**Kuntic *et al*, 2013 ; Ibáñez *et al*, 2023**).

### 1.2.4. Les critères d'un radioprotecteur idéal

Des milliers de composés chimiques et de médicaments ont été évalués pour leur potentiel radioprotecteur, mais la plupart d'entre eux font encore l'objet d'essais précliniques. La condition préalable la plus importante pour le développement d'un radioprotecteur idéal est sa toxicité minimale à la dose à laquelle il est administré. En outre, il doit avoir une capacité de piégeage des radicaux libres, une capacité d'immunomodulation, être anti-inflammatoire, promouvoir les enzymes de réparation de l'ADN, augmenter les enzymes antioxydantes et améliorer la récupération du système hématopoïétique et immunitaire (**Fig.1.9**) (**Haritwal et al, 2022**). Aussi, il doit être doté d'un effet protecteur sélectif sur les tissus sains, sans effet protecteur sur les cellules tumorales ; avoir un profil de stabilité acceptable (tant pour le produit actif en vrac que pour le composé formulé) ; avec une longue demi-vie ; avoir une voie d'administration acceptable (orale, sous-cutanée ou intramusculaire) avant ou après l'irradiation pour couvrir toutes les circonstances ; être efficace pour tout type et toute dose d'irradiation (**Minaei et al, 2021**) être efficace dans la fourniture d'une protection multiforme, prévenir les effets aigus ou chroniques directs et indirects sur les tissus sains ; être compatible avec une large gamme d'autres médicaments ; être facilement accessible et économique et ne pas nécessiter de manipulations particulières ; ne pas nécessiter de manipulations et des températures de transport particulières (**Baatout,2023**).



**Figure 1.9** : Critères pour devenir un radioprotecteur idéal

Pour répondre à ces exigences, une variété d'agents immuno-modulateurs, de facteurs stimulant l'hématopoïèse, de divers agents chélateurs et de facteurs de croissance ont été étudiés. Cependant, la plupart de ces agents ont montré un degré de protection variable et



aucun d'entre eux n'est encore utilisable pour des essais chez l'homme. Plus important encore, aucun d'entre eux n'a la capacité de fournir une radiomitigation (protection post-irradiation) (**Minaei et al, 2021**). A l'heure actuelle, aucun composé ne respecte l'ensemble de ces critères. Cependant, certains d'entre eux présentent une efficacité intéressante et spécifique mais avec des effets secondaires non négligeables. Des études cliniques ont été réalisées afin de déterminer le traitement le plus efficace et le moins toxique possible (**Damien Cressier, 2010**).

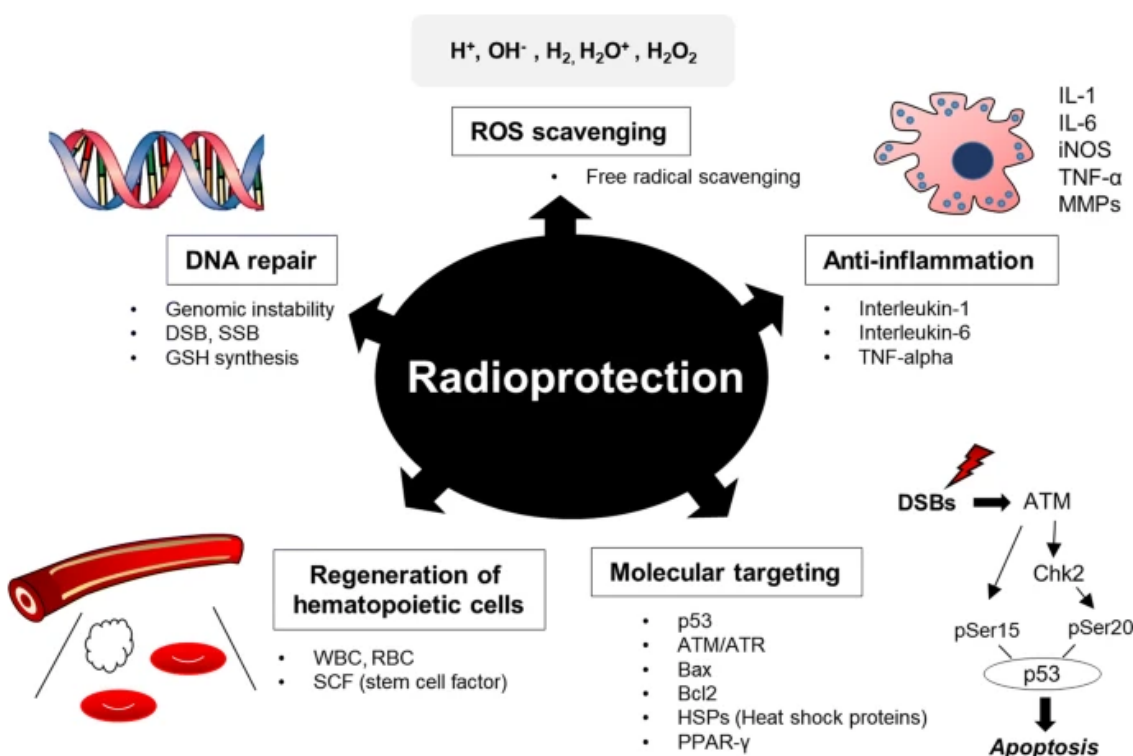
### 1.2.5. Les différentes voies de radioprotection

L'étude du mode d'action des différents composés synthétisés pour la radioprotection chimique a permis depuis les années 1980 de comprendre les mécanismes de base de la radioprotection chimique. Initialement dominée par les thiols, la radioprotection chimique s'est ouverte aux composés « non-thiols » tels que les dérivés de vitamines, les métalloéléments ainsi que le matériel biologique tel que les inhibiteurs de protéases ou les antagonistes aux canaux calcium. Ainsi, depuis quelques années, de nouvelles voies de radioprotection autres que chimiques ont été explorées (**Cressier, 2010**). De plus, alors qu'en général les composés radioprotecteurs sont plus actifs lorsqu'ils sont injectés avant irradiation, certains composés peuvent permettre de moduler à posteriori les dommages dus aux radiations. Il est supposé que ces derniers composés agissent sur la régénération et la repopulation des éléments dégradés dans les tissus essentiels au maintien des fonctions vitales. Le très fort potentiel thérapeutique et les avantages de la combinaison d'un composé chimique injecté en pré-irradiation limitant les dégâts à l'organisme et d'un composé biologique accélérant la régénération tissulaire démontré par Weiss et al. semble une voie de recherche intéressante pour la radioprotection (**Kumar et al, 1990 ; Damien Cressier, 2010**).

Les radioprotecteurs sont divers et agissent par des mécanismes très variés que l'on peut classer en 12 catégories : 1) piégeage des radicaux libres ; 2) activation des enzymes de la réparation de l'ADN ; 3) synchronisation des cellules ; 4) modulation des gènes sensibles à l'oxydoréduction ; 5) formation des disulfures mixtes et la stabilisation de la cible ; 6) induction de radioprotecteurs cellulaires tels que la superoxyde dismutase ou le glutathion... ; 7) activation de la restauration hématopoïétique et des fonctions immunitaires par la stimulation et la maintenance de la prolifération de cellules souches au niveau de la moelle osseuse ; 8) induction d'une hypoxie ; 9) modulation des facteurs de croissance et des cytokines ; 10) inhibition de l'apoptose ; 11) réaffectation des médicaments ; 12) interaction et chélation des radionucléides ; et méthodes thérapeutiques de régénération des tissus telles que

13) thérapie génique ; et 14) thérapie par les cellules souches. Le mécanisme de radioprotection le plus courant est le piégeage des radicaux libres, tandis que la modulation des facteurs de croissance, des cytokines et des gènes d'oxydoréduction apparaît comme une stratégie efficace. Les thérapies géniques et les thérapies par cellules souches sont en cours de développement et peuvent être appliquées dans un avenir proche pour minimiser les effets secondaires de l'exposition aux rayonnements grâce à la régénération des tissus (**Krishna et al, 2018**). Ainsi, la gestion de l'exposition aux rayonnements peut nécessiter une approche holistique et multimécanique afin de parvenir à une radioprotection optimale pendant la radiothérapie des patients cancéreux et en cas d'accidents ou d'urgences nucléaires (**Baatout, 2023 ; Mishra et al, 2018**).

La figure (**Fig.1.10**) résume les mécanismes cellulaires des composés naturels ayant des effets radioprotecteurs.

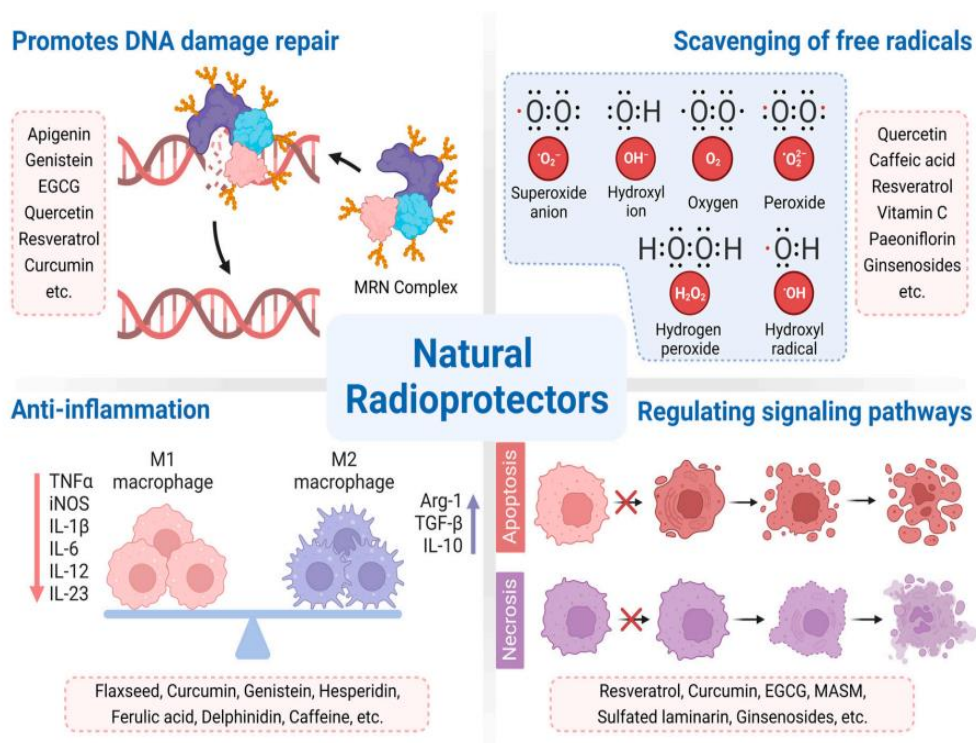


**Figure 1-10 :** Résumé des mécanismes cellulaires des composés naturels ayant des effets radioprotecteurs. Les composés naturels ayant des effets radioprotecteurs agissent par le biais de différents mécanismes, tels que le piégeage des radicaux libres, l'anti-inflammation, la facilitation de l'activité de réparation, la régénération des cellules hématopoïétiques et l'influence sur les niveaux moléculaires. Les mécanismes des radioprotecteurs sont impliqués dans la réponse aux radiations et la réparation des lésions tissulaires, qui peuvent constituer des cibles pharmacologiques potentielles pour le développement de radioprotecteurs idéaux. DSB rupture de double brin, SSB rupture simple brin,

WBC globules blancs, RBC globules rouges (Sarin et al, 2022).

### 1.2.5.1. Les Mécanismes d'action des radioprotecteurs naturels

Les agents radioprotecteurs peuvent atténuer les dommages causés par les rayonnements lorsqu'ils sont administrés à titre prophylactique (avant l'exposition) ou thérapeutique (après l'exposition). La figure (Fig.1.11) et (Fig.1.12) montre les mécanismes de radioprotection des produits naturels et des plantes dans la thérapie du cancer.



**Figure 1-11** : Résumé des mécanismes de radioprotection des produits naturels.

Abréviations : Arg-1, arginase-1 ; EGCG, épigallocatechine gallate ; IL, interleukine ; iNOS, oxyde nitrique synthase ; MASM, (6aS, 10S, 11aR, 11bR, 11cS)-10 méthylamino-dodécahydro-3a, 7a-diazabenzodeanthracène-8-thione ; complexe MRN, complexe Mre11-RAD50-Nbs1 ; TGF- $\beta$ , facteur de croissance transformant- $\beta$  ; TNF- $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale (Zhang Yi et al, 2023).

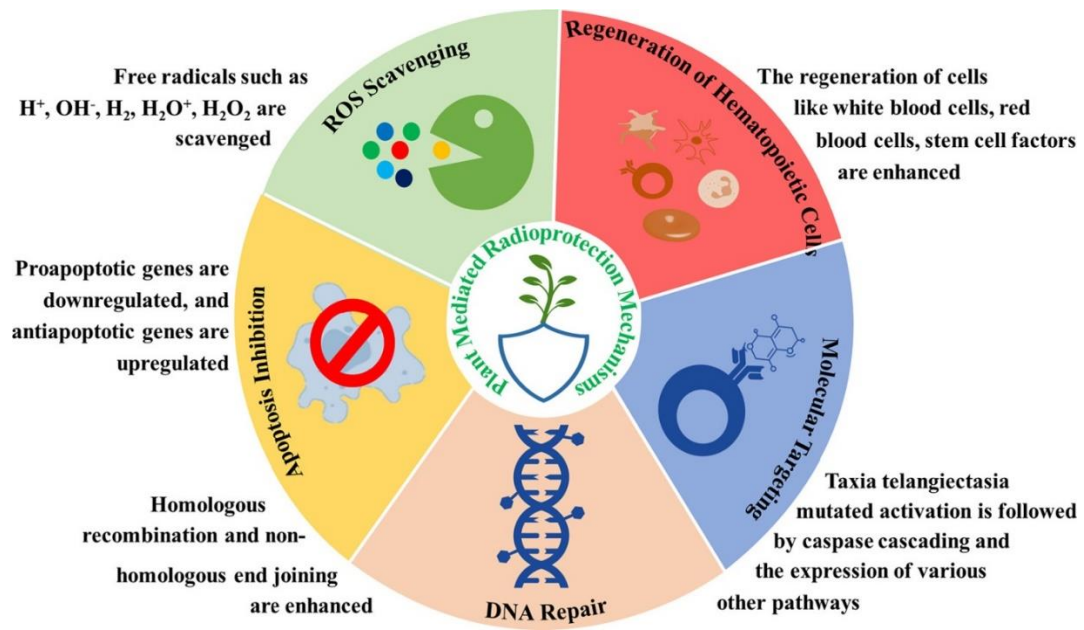


Figure 1.12 : Résumé des mécanismes de radioprotection des plantes

### 1.3. Le Romarin *Rosmarinus officinalis* L

Le Romarin est une herbe médicinale et aromatique ligneuse, à l'arôme persistant et au goût amer et astringent, originaire de la région méditerranéenne et d'Asie (**Zhaeintan 2022**).

Le nom latin du Romarin est *Rosmarinus officinalis* L. Cependant, deux autres espèces de Romarin existent : *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* mais n'ont que peu d'intérêt médicinal (**Leplat, 2017**). L'épithète spécifique "officinalis" rappelle que le Romarin est une plante médicinale. (**Leplat, 2017**).

Une variété cultivée de *Rosmarinus officinalis* est représentée sur la figure (**Fig.1.13**)



**Figure 1-13 :** *Rosmarinus officinalis* (variété cultivée) (**Leplat, 2017**).

Le romarin est un arbuste buissonnant ramifié à feuilles persistantes, atteignant une hauteur d'environ un mètre, avec des tiges dressées, des fleurs bleu blanchâtre et des feuilles vert foncé (**Soyal et Jindal, 2007**). La période de floraison est variable, elle a lieu principalement au printemps et parfois toute l'année quand les conditions sont idéales pour le Romarin (**Leplat, 2017**).

### 1.3.1. Classification Botanique (Francisco José González, 2020) (Claire Hoefler, 1994)

Embranchement : Spermaphytes

Sous-Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-Classe : Gamopétales

Ordre : Tubiflorales

Sous-Ordre : Iamiales

Famille : Iamiacées ou Labiatae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *officinalis*

Nom accepté : *Rosmarinus officinalis* L. (*Salvia rosmarinus* Scheid)

Le Romarin apparaît encore beaucoup sous son ancien nom latin, *Rosmarinus officinalis* mais il faut savoir qu'il a été reclassé en 2017 dans le genre *Salvia*, dont font partie les sauges. Sa nouvelle dénomination botanique officielle est donc *Salvia rosmarinus*.

### 1.3.2. Composition chimique de *Rosmarinus officinalis* L

La composition chimique de la plante dans son ensemble dépend du lieu de croissance et du moment de la récolte (idéal quand le végétal a le maximum d'essence) (Leplat, 2017).

Le romarin contient des flavonoïdes (lutéoline et apigénine), des diterpènes (carnosol et acide carnosique) et des acides phénoliques (Makaremi, 2022). Le tableau 1 présente les molécules bioactives les plus abondantes trouvées dans le romarin. Il ne s'agit que d'un résumé, car la composition finale varie en fonction de la variété, de l'origine, de la partie de la plante et de la méthode d'extraction (González, 2020). Selon Andrade et al (Andrade, 2018), les molécules les plus fréquemment étudiées dans le romarin sont l'huile essentielle volatile (27%), l'acide carnosique (30%), l'acide rosmarinique (12%) et l'acide ursolique (6%).

**Tableau 1-2 : Principales molécules bioactives du romarin (Leplat, 2017).**

Principaux Monoterpènes	1,8-cinéole (eucalyptol), camphre (cétone), $\alpha$ -pinène, bornéol, $\beta$ -pinène, limonène et p-cymène, verbénone (cétone) et sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène).
Principaux Diterpènes	Acide carnosique, carnosol, rosmanol, épirosmanol, isorosmanol et rosmaridifénol
Principaux Triterpènes	Acide oléanolique, acide ursolique, bétuline, $\alpha$ -amyrine et $\beta$ -amyrine
Flavonoïdes	Lutéoline, apigénine, genkwanine, diosmétine, hispiduline, 5hydroxi-7,4'-diméthoxy-flavone et cirsimaritrine
Acides Phénoliques	Acide caféique, acide chlorogénique et acide rosmarinique.

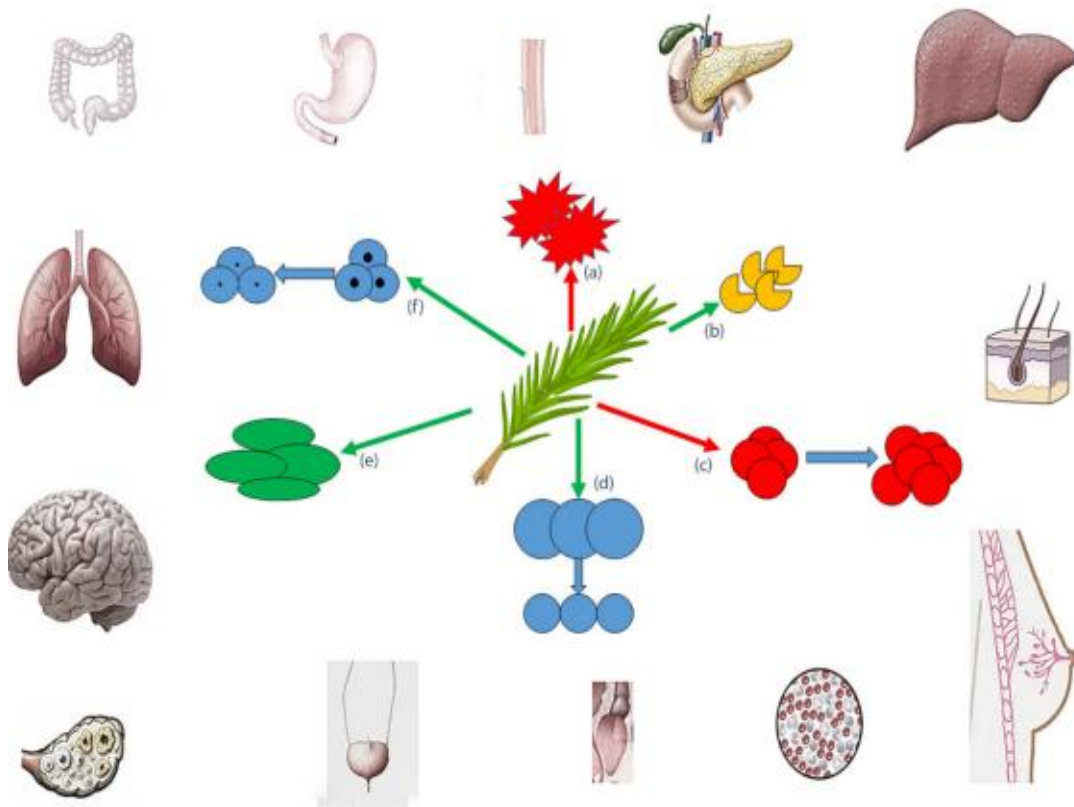
### 1.3.3. Propriétés thérapeutiques du romarin

Le romarin a été décrit comme un médicament miracle dans la littérature et dans diverses monographies médiévales de médicaments (**Garima Sancheti, 2007**).

Outre les utilisations culinaires dues à son arôme caractéristique, cette plante est largement utilisée par les populations comme carminatif, antispasmodique, analgésique, tonique circulatoire, pour stimuler la croissance des cheveux et pour améliorer les dysfonctionnements de la mémoire (**Hiwa M, 2020**). Elle est également utilisée comme antirhumatismal, carminatif, diurétique, expectorant, antiépileptique, hépatoprotecteur et antimutagène (**Fig1.14**) (**Soyal, 2007**). Elle exerce aussi une action anti-inflammatoire et anti-athérosclérotique (**Alcaraz, 2014**). Un effet radioprotecteur corrélé à la présence des polyphénols, responsable de son activité antioxydante (**Hasanzadeh, 2022**) (**Fig1.15**). L'extrait du romarin présente aussi des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anticancéreuses (**Jaglanian, 2020**).

D'autres activités pharmacologiques sont rapportées notamment la capacité d'atténuer l'asthme, la cataracte, les coliques néphrétiques, l'hépatotoxicité, l'ulcère gastroduodéal, les cardiopathies ischémiques, réduction de la pression artérielle myocardique grâce à l'acide rosmarinique, action antiulcéreuse, réduction de la peroxydation lipidique dans le cœur et le cerveau, effets antiangiogéniques et neuroprotecteurs de l'acide carnosique et du carnosol, actions antivirales, néphroprotectric, réduction de la glycémie, relaxant musculaire et traitement de l'allergie cutanée (**de Oliveira, 2019 ; Hassani, 2016 ; Hiwa M, 2020 ; Mohammad, 2022**).

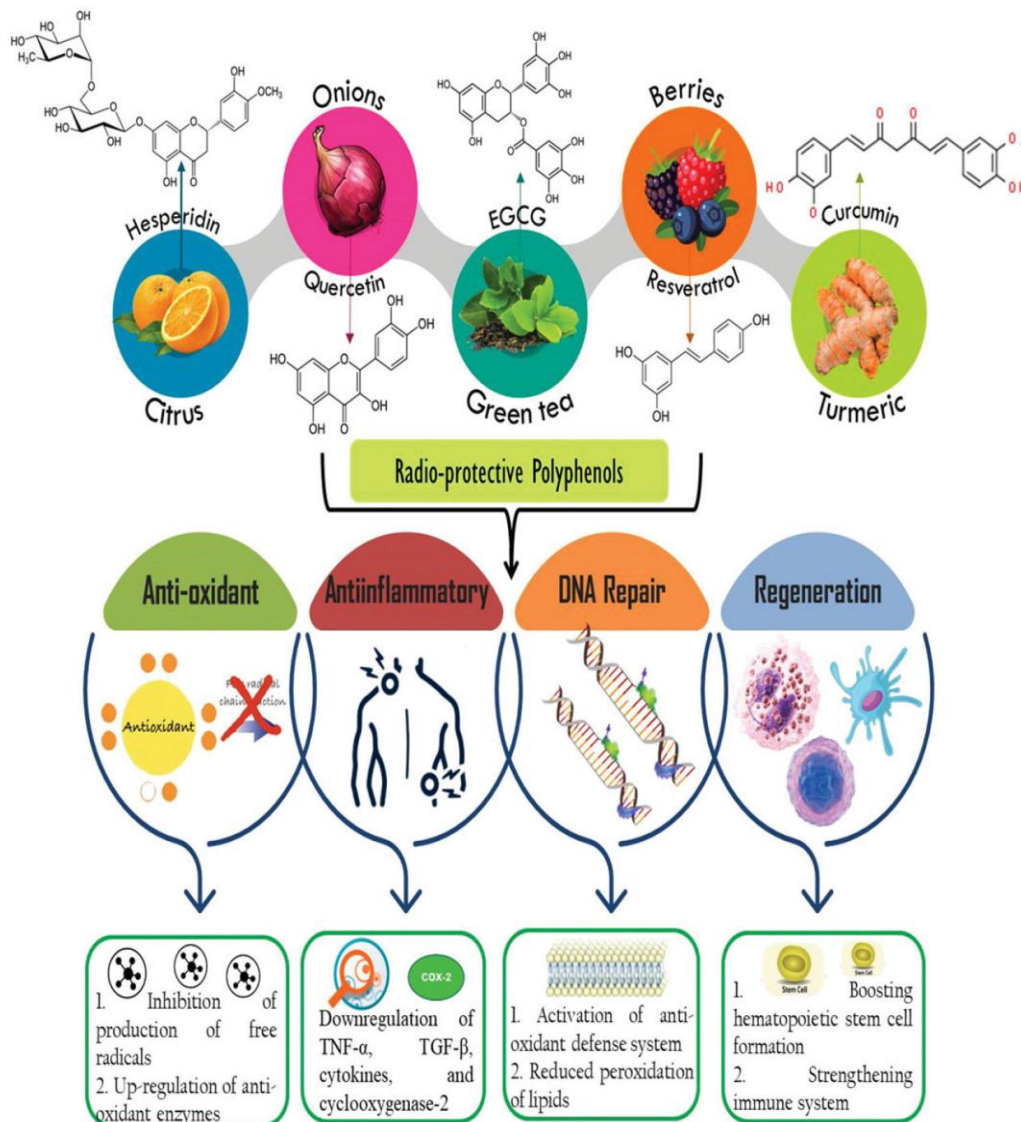
Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré les puissantes propriétés antitumorales (**Fig.1.14**) et anti-prolifératives de l'extrait de romarin (**Makaremi, 2022**).



**Figure 1-14** : Effets du romarin sur différents types de cancers.

(Flèches rouges : inhibition/blocage ; flèches vertes : promotion) : (a) arrêt de l'activation des substances cancérogènes, (b) augmentation des activités des enzymes antioxydantes, (c) réduction de l'inflammation stimulant les tumeurs, (d) diminution de la croissance cellulaire, (e) stimulation de la mort cellulaire programmée, (f) promotion de la réduction de l'angiogenèse et de l'invasion des tumeurs (**Alessandro Allegra, 2020**).





Natural sources and biological activities of some known radio-protective polyphenols with their possible action mechanisms.

**Figure 1-15 :** Sources naturelles et activités biologiques de certains polyphénols radioprotecteurs connus et leurs mécanismes d'action possibles (Muhammad Adnan, 2022).

Récemment, les extraits de romarin ont été approuvés par la législation de l'Union européenne, ce qui permet aux entreprises alimentaires d'utiliser la mention « antioxydant » (E392) : extrait de romarin pour la conservation des aliments (Berivan CECEN, 2023 ; Joana M Andrade, 2018).

# **Deuxième chapitre : Matériels & Méthodes**

# Chapitre 2

## 2. Matériels & Méthodes

Notre étude a été menée au sein de Laboratoire de Radiobiologie du Département de Radiobiologie et Science du Vivant (DRSV) appartenant à la Division de la Radiobiologie et de la Dosimétrie des Rayonnements ionisants (DRD) du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger.

### 2.1. Matériels

#### 2.1.1. Matériel végétal

L'espèce *Rosmarinus Officinalis.L* a été collectée, au moment de la floraison (mois de mars et mai) au niveau du Jardin d'Essai de Hamma d'Alger. Le matériel végétal a été authentifié par un botaniste du département de conservation du végétal, du jardin botanique du Hamma. Le numéro d'accession de *Rosmarinus officinalis. L.* est HBGH1390.

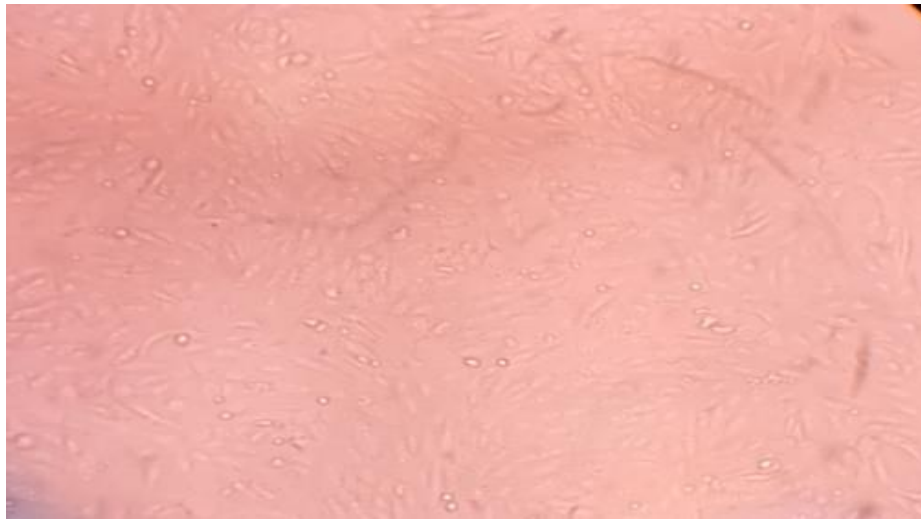
Les feuilles fraîches du romarin ont été séchées à l'air pendant 3 à 4 semaines à température ambiante dans une pièce bien ventilée. Le matériel végétal séché a été réduit en poudre fine à l'aide d'un moulin électrique. Puis stocké dans des conteneurs hermétiques pour le protéger de l'oxydation, conformément aux lignes directrices de l'Organisation mondiale de la santé sur les bonnes pratiques agricoles et de collecte (GACP) pour les plantes médicinales (OMS, 2003).

#### 2.1.2. Lignée cellulaire

Nous avons travaillé sur la lignée cellulaire Vero, Cette lignée a été isolée à partir de cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain. Caractérisée par une forme fusiforme avec un large cytoplasme et un noyau aneuploïde (**Fig2.1**) (**Tab.2.1**)

**Tableau 2.1. :** Caractéristique de la cellule Vero (PTIOT, 2009).

Origine	Rein de singe vert adulte d'Afrique
Transformation	Naturelle : au cours de passage successifs
Tumorigénicité	Non tumorigène (définition du WHO) : Pas de nodules dont la taille augmente avec le temps (> 21) Pas de métastases
Caryotype	Aneuploïde : 58 chromosomes dans 66% des cellules
Culture	Adhérente
Référence ATCC	CCL81, 124° passage
Traçabilité	Suivie depuis son origine, traçabilité complète (milieu, sérum)
Permissivité	SV-40,SV-5, rougeole, arbovirus, réovirus,rubéole , adenovirus simien, poliovirus, grippe, virus respiratoire syncytial, virus vaccinia...
Caractéristique	Ne produit pas d'interféron

**Figure 2.1 :** photographie de la lignée cellulaire Vero au microscope inversé Gx400

### 2.1.3. Equipements, réactifs et milieux de culture

Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire de type PSM II BIOHAZAR SafeFAST EL dans des conditions rigoureuses de stérilité absolue.

L'équipement, les réactifs et les milieux de culture utilisés sont cités dans **l'annexe1**

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation de l'extrait brut lyophilisé de romarin



**Figure 2.2** : Les étapes de préparation de l'extrait lyophilisé de romarin

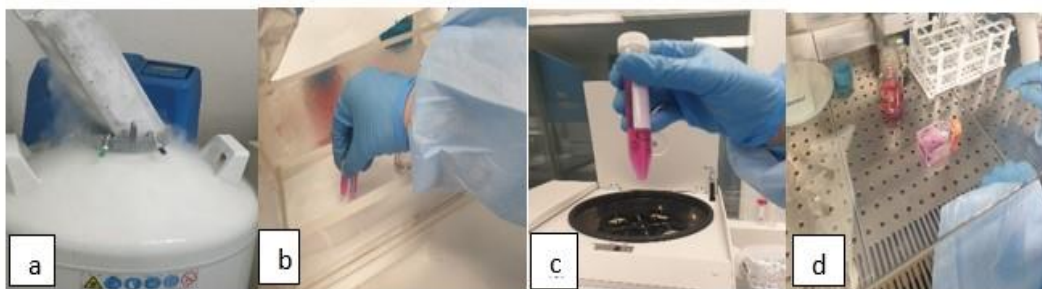
Les extraits utilisés dans l'expérimentation ont été préparés par reconstitution des lyophilisats avec du DMEM (10%) (Dulbecco's Modified Eagles Medium) jusqu'à une concentration finale de 20 mg/ml, filtré à 0,22 µm et réfrigérés jusqu'à leur utilisation. Une gamme de concentration a été préparée (1, 2, 3, 4, 5 et 20mg/ml).

## 2.2.2. Culture cellulaire

### 2.2.2.1. Décongélation des cellules Vero

Les cellules Vero cryoconservées à  $-196^{\circ}\text{C}$  (azote liquide) dans leur milieu de culture riche en sérum de veau fœtal (10 à 20%) en présence du cryoprotecteur (DMSO) ont été décongelées rapidement au bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après homogénéisation de la suspension, le contenu a été transvasé dans un tube Falcon stérile de 50ml, renfermant environ 5ml de milieu DMEM à 20%SVF puis centrifugées à 1000 rpm à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 7 min afin d'éliminer le cryoprotecteur (DMSO) et récupérer le culot. Celui-ci a été reconstitué dans le milieu de culture frais DMEM à 20% de SVF et 1% de peni-strepto et ensemencé dans un flasque à bouchant filtrant de  $25\text{ cm}^2$  légendée au préalable (nom de la lignée, nombre de passage, la date et le nombre de cellules).

Des mouvements en 8 ont été effectués afin de répartir uniformément les cellules sur le fond du flasque, ce dernier a été mis dans l'incubateur à  $37^{\circ}\text{C}$  sous une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 24h. Les cellules sont ensuite observées quotidiennement au microscope inversé pour contrôler la confluence cellulaire (**Fig2.3**).



a) Rack avec cryoboîtes ; b) décongélation des cryotubes ; c) centrifugation de la suspension cellulaire ; d) mise en culture dans un flask T25

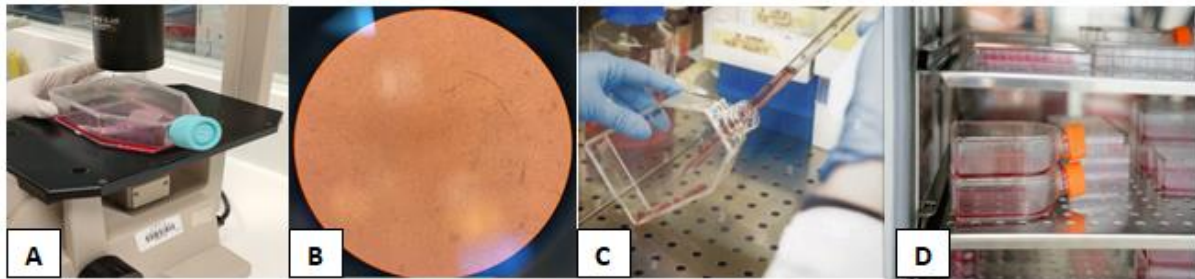
**Figure 2.3** : Les étapes de la décongélation des cellules Vero

### 2.2.2.2. Entretien et suivis de la culture

Des observations quotidiennes au microscope inversé (OLYMPUS K2) au grossissement Gx400 de la culture cellulaire ont été effectuées, afin de contrôler la viabilité, la croissance cellulaire, la confluence des cellules et éventuellement vérifier l'absence de contamination pour maintenir une culture stable. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours afin que les nutriments du milieu ne deviennent pas limitant

pour le bon développement des cellules.

Lorsque la confluence atteint les 80% ; un passage (repiquage) des cellules est entrepris on procède alors à un transférer des cellules dans des flasque de culture de surface plus grandes (T75) et (T175)) contenant du milieu DMEM frais à 10% SVF. Après avoir éliminé le milieu de culture et lavé deux fois le tapis cellulaire avec 10 ml de PBS, on ajoute 1,5 ml de trypsine afin de détacher les cellules de leur support. Après un détachement complet, la trypsine est arrêtée par l'action du sérum de veau foetal contenu dans le milieu DMEM (10% SVF). Les cellules ainsi récupérées sont inoculées dans une boîte plus grande avec du milieu frais et incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> (**Fig2.4**).



**Figure 2-4 :** Entretien des cellules Vero, A) observation au microscope inversé B) confluence cellulaire C) transfère des cellules dans des flasque T75 D) incubation des cellules.

### 2.2.2.3. Dénombrement des cellules

La numération cellulaire par unité de volume de la suspension cellulaire a été réalisée par la cellule de Malassez sous microscope à phase inverse au grossissement Gx400 (**Fig.2.5**). Pour effectuer la numération, une prise de 0,5ml de la suspension cellulaire dans un tube Eppendorf a été réalisée. Le nombre de cellules a été déterminé selon la formule suivante :

$$N = NC/5 \times 10^5 \times (1/D) \times V \quad (2.1) \text{ (Faurie, 2019)}$$

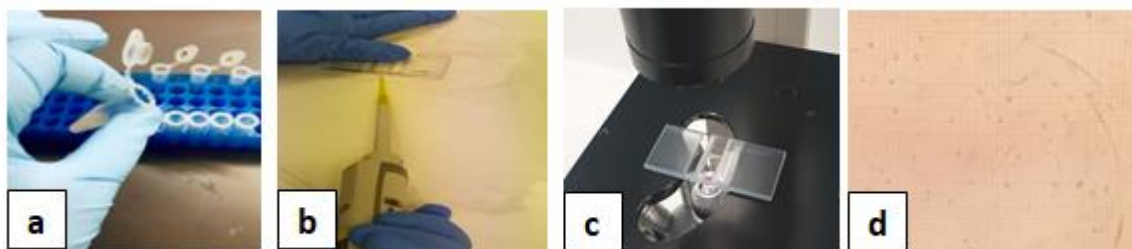
Avec

**N** : Nombre de cellules

**NC** : Nombre de cellules observées sur 5 carreaux

**V** : Volume total de la suspension cellulaire

**D** : Dilution



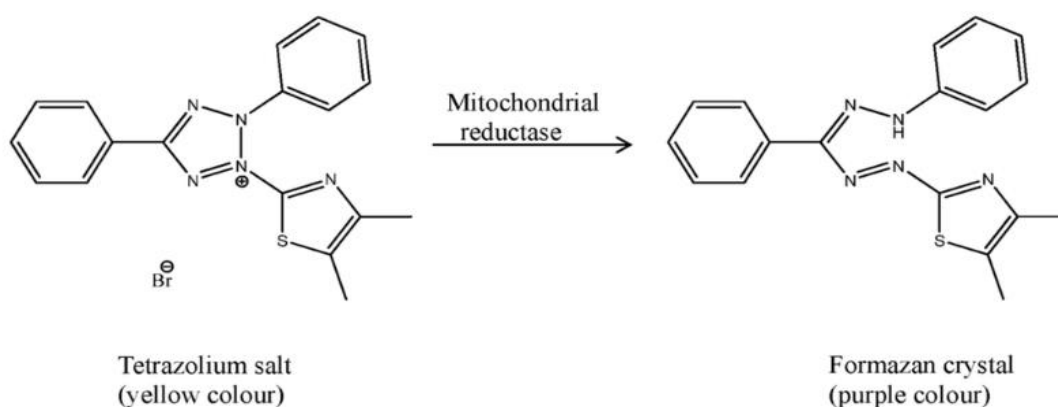
**Figure 2-5 :** Etapes du dénombrement cellulaire

a) prise de la suspension cellulaire dans un tube Eppendorf b) Injection de la suspension dans la cellule de Malassez c) cellules de Malassez sous microscope inversé GX400 ; d) comptage des cellules.

### 2.2.3. Evaluation de la cytotoxicité par le test MTT

La toxicité cellulaire a été étudiée via l'utilisation du MTT (Invitrogen, Molecular Probes, nUSA).

Le test de viabilité au MTT est une méthode colorimétrique permettant le comptage rapide des cellules vivantes. Cette méthode repose sur l'utilisation du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Ce sel contient un anneau de tétrazolium qui est réduit en formazan en présence de la succinate déshydrogénase mitochondriale, une enzyme de la chaîne respiratoire des mitochondries (**Fig2.4**) (**Tominaga et al, 2019**). Cela forme alors un précipité de couleur violette. La teneur en précipité formée est alors proportionnelle à la quantité de mitochondries, et donc de cellules vivantes présentes (mais aussi à l'activité métabolique de chaque cellule). Il est ensuite possible de mesurer par spectrophotométrie la quantité relative de cellules vivantes et avec un métabolisme actif.



**Figure 2-6 :** Réduction du sel de mono-tétrazolium en formazan par reductase mitochondriale (**Tominaga et al, 2019**).



### 2.2.3.1. Préparation des plaques à 96 puits

A partir d'une boîte de T25 mis en culture et après une confluence, les cellules ont étéensemencées sur des plaques de culture à 96 puits à un volume de 100µL de la suspension cellulaire à raison de 10<sup>4</sup> cellules/puits et incubées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>, pendant 24h (Fig.2.6).

### 2.2.3.2. Mise en contact de l'extrait brute du Romarin avec les cellules Vero

Après une culture de 24 heures, les cellules Vero sont mises en contact avec l'extrait à différentes concentrations : 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml et 20mg/ml en triplicata et sont ensuite incubées dans les mêmes conditions (Fig.2.7).



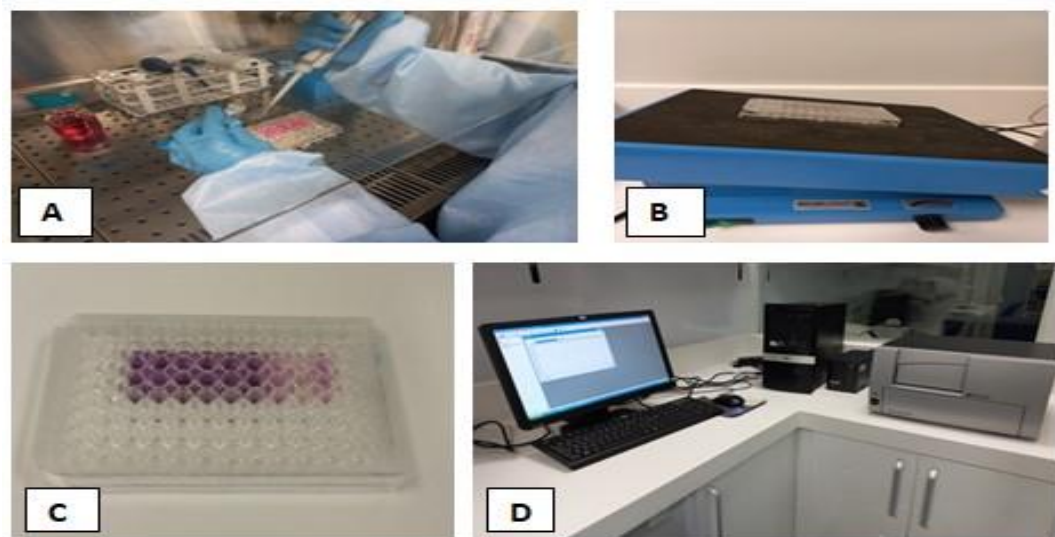
**Figure 2-7 :** Traitement des cellules Vero avec l'EBR

a) ensemencement des cellules sur microplaques ; b) les différentes concentrations de l'EBR de 1-20mg/ml ; c) incubation des cellules après traitement avec EBR

### 2.2.3.3. Le test MTT

Après une incubation des cellules Vero au temps voulu (24h, 48h), le surnageant des puits a été éliminé et renouvelé avec du milieu DMEM frais. Ensuite, 20µL de la solution MTT (2mg/mL dans du PBS) ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont été incubées à l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidité) de 1 à 4heures.

A la fin de l'incubation, le surnageant a été retiré, et 100µL du DMSO ont été rajouté dans chaque puit pour dissoudre l'excès du colorant ensuite on incube la plaque à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidité pendant 10 min. Après une agitation de 2 min, la lecture de D.O. 540 nm a été effectuée au lecteur de microplaques (BioTeksynergy HT) (Fig.2.8).

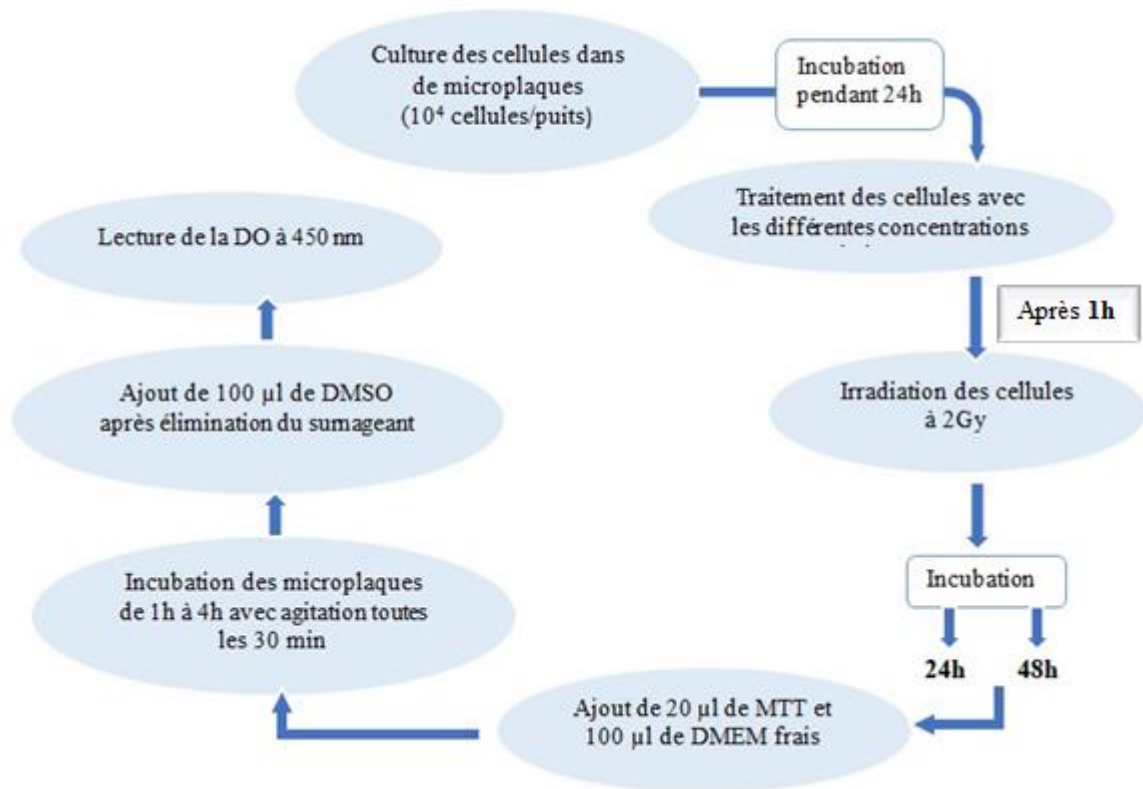


**Figure 2-8 :** Test de viabilité MTT

A) traitement des cellules avec la solution MTT, B) Agitation, C) couleur violette après traitement, D) Lecture de l'absorbance à 540nm

#### **2.2.4. Evaluation de la survie après irradiation gamma par le Test MTT**

La recherche d'un éventuel effet radioprotecteur de l'extrait brut du romarin sur les cellules irradiées a été réalisée via l'étude de la viabilité des cellules par le test MTT. La procédure est résumée dans la figure ci-dessous (**Fig.2.9**) :



**Figure 2.9** : Schéma récapitulatif des étapes de MTT pour l'évaluation de la survie cellulaire à 24h et 48h d'une post-irradiation

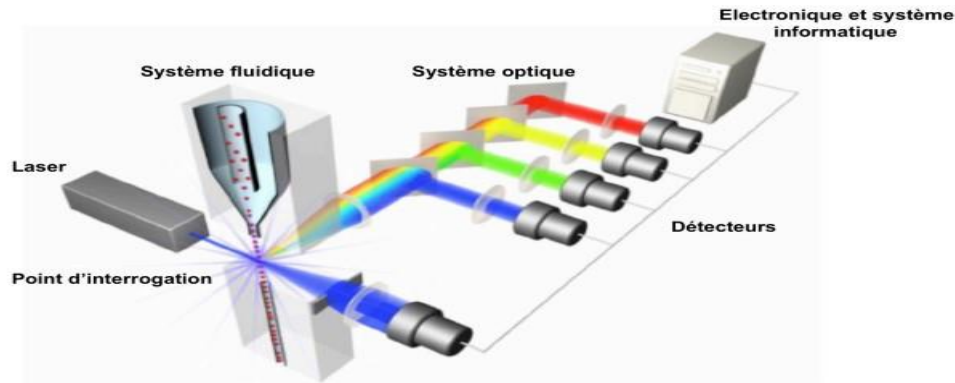
### 2.2.5. Analyse par cytométrie en flux

L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée à l'aide du cytomètre en flux BD FACSLyric™ équipé d'un laser bleu 488 nm pour l'excitation du FITC (vert) et du IP (rouge). Lors de l'utilisation du cytomètre de flux FACSLyric™, un volume d'échantillon défini de 500 µl a été analysé. Au moins 10 000 événements cellulaires ont été analysés pour chaque échantillon. Des contrôles négatifs non colorés, ainsi que des contrôles positifs, ont été inclus dans toutes les analyses.

- **Principe**

Cette technique consiste à faire défiler dans une veine liquide l'échantillon en suspension devant un faisceau lumineux excitateur. La suspension cellulaire est injectée dans l'axe de cette veine qui s'écoule à travers une buse de plus faible diamètre. La veine liquide est traversée par un faisceau lumineux, le plus souvent de type laser et les cellules ainsi éclairées émettent un certain nombre de signaux optiques, qui sont détectés, amplifiés et

convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques (**Fig.2.10**). Elles sont analysées grâce à l'unité informatique et l'affichage simultané des paramètres FSC et SSC traités par le logiciel, permet de visualiser chaque cellule sous forme de point (**McKinnon, 2018**)



**Figure 2-10** : Composants majeurs d'un cytomètre

#### 2.2.5.1. Mise en contact de l'EBR avec les cellules Vero

Après entretien des cellules Véro, une série de flasks a été préparé en duplicate et incubée pendant 24h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. L'irradiation des cellules à une dose de 2Gy, a été effectuée après une heure de traitement avec l'EBR à une concentration de 1mg/ml (solution préalablement filtrée à 0.22µm) et incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les flasks sont réparties de cette manière :

Deux flasks non traités/ non irradiés (témoins)

Deux flasks traités avec EBR / non irradiés

Deux flasks non traités / irradiés à 2Gy

Deux flasks traités avec EBR / irradiés à 2Gy

Après 24h d'incubation, le milieu retiré est récupéré (cellules mortes) et deux lavages au PBS sont effectués avant de réaliser une trypsination en ajoutant 0.5ml de trypsine dans chaque flask permettant le détachement des cellules. Après incubation de 3min, la réaction de la trypsine est arrêtée avec du milieu frais et les cellules sont récupérées et centrifugées (1500 rpm pendant 7min à 4°C) (**Fig.2.11**).

Les cellules obtenues sont reconstituées dans une solution tampon : Binding Buffer1X à une concentration de  $10^6$  cellules/ml (**Fig.2.11 c**).



**Figure 2-11** : Préparation de la suspension cellulaire

a) Récupération des cellules Vero ; b) Centrifugation à 1500 rpm pendant 7min à 4°C ; c) Reconstitution des cellules dans la solution tampon Buffer Binding.

#### 2.2.5.2. Analyse des différents traitements sur l'apoptose des cellules Vero

Pour effectuer cette analyse, un kit prêt à l'emploi contenant la fluorescéine isothiocyanate-conjugated annexin V (Annexin V-FITC), l'iodure de propidium (IP) et le Binding Buffer 10X a été utilisé.

Le test est basé sur l'exposition des phosphatidyl-serines sur la face externe de la membrane plasmique.

Lors de l'entrée d'une cellule dans un processus de mort programmée ou apoptose, les résidus phosphatidylsérine sont transloqués sur le versant extracellulaire, aboutissant à une perte d'asymétrie de la membrane. L'annexine-V possédant une forte affinité pour ces résidus permet de détecter la phase précoce d'entrée en apoptose. Pour les cellules en nécrose, elles fixent non seulement l'Annexine V-FITC mais aussi l'iodure de propidium car la membrane est devenue poreuse. L'annexine est utilisée en conjonction avec l'iodure de propidium (IP) pour différencier les cellules vivantes des cellules apoptotiques et des cellules en nécrose.

La suspension cellulaire ( $10^5$  cellules/100  $\mu$ l) sera doublement marquée par 5 $\mu$ l de l'Annexine V-FITC et 5 $\mu$ l de l'IP et incubée pendant 15 min à l'abri de la lumière. Ensuite 400 $\mu$ l de solution tampon (Buffer Binding) est ajoutée et filtrés avant l'analyser (**Fig.2.12**).



**Figure 2-12** : Préparation des Facs pour l'analyse par cytométrie en flux

a) Filtration de la suspension cellulaire b) Facs prêts à analyser

L'analyse des cellules a été réalisée par cytométrie en flux (BD FACS Aria) (**Fig 2.13**) en ne dépassant pas 1h d'analyse.

Le nombre de cellules à analyser doit être entre  $5.10^5$  à  $10^6$  cellules par échantillon avec un nombre d'évènement collectés correspond à 10 000 évènements par tube. Le traitement des résultats est assuré à l'aide d'un logiciel d'analyse des données : Diva Software v.8.0.2.

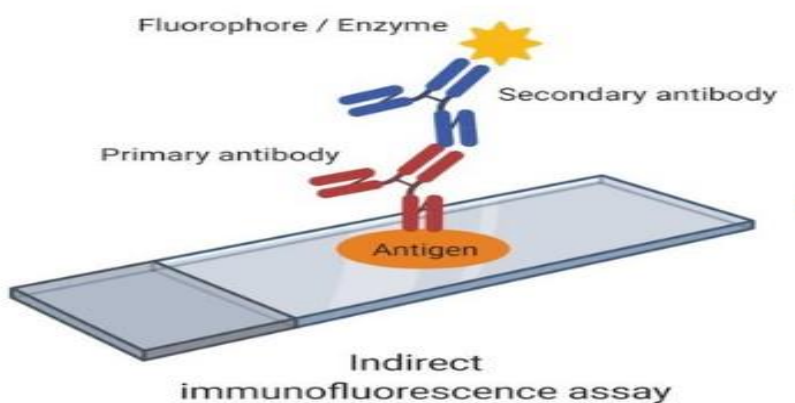


**Figure 2-13** : Photographie du cytomètre en flux (BD FACS Aria)

### 2.2.6. Détection des cassures double-brin d'ADN par immunofluorescence

Afin d'étudier l'expression *in situ* de la protéine H2AX utilisée sous sa forme phosphorylée comme bio-marqueur de cassure double-brin qui se manifeste après traitement combiné des cellules (contact avec l'EBR suivi d'une irradiation à 2Gy), nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte. Cette dernière consiste à un marquage de l'antigène étudié par un anticorps primaire, qui sera lui-même marqué à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (FITC de fluorescence verte) et est dirigé spécifiquement contre la partie Fc de l'anticorps primaire (**Fig.2.14**). Ce double marquage permet d'amplifier le signal de fluorescence.

Cette technique permet de visualiser quantitativement l'expression *in situ* de la protéine étudiée et donc l'estimation du nombre de cassures double-brin.



**Figure 2-14** : Schéma du principe d'immunofluorescence indirecte

#### 2.2.6.1. Ensemencement des cellules Vero sur les lamelles

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles stériles à raison de  $10^5$  cellules/100 $\mu$ l par lamelle, réparties dans 10 boîtes de pétri de 35mm (3 lamelles par boîte pétri). Un volume de 2ml de milieu DMEM est ajouté après avoir obtenu l'adhésion des cellules au support, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h (**Fig.2.15**).

#### 2.2.6.2. Irradiation des cellules Vero

Les cellules en phase exponentielle ont été traitées avec une concentration d'EBR de 1mg/ml et incubées (37°C, 5% CO<sub>2</sub> (**Fig.2.15**)). Après une heure d'incubation, les cellules sont exposées aux rayonnements gamma à une dose de 2Gy. Un lot de six (6) boîtes de pétri est

irradié (à 2Gy), tandis que quatre (4) autres boîtes (non traitée/non irradiée, traitée/ non irradiée) ont été laissées dans l'incubateur.

Après l'irradiation les cellules sont immédiatement remises en incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) à différents temps (1h, 4h et 24h).

### **2.2.6.3. Marquage des cellules aux anticorps**

#### *2.2.6.3.1. Fixation et lyse*

Après chaque temps post-irradiation, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été rincées par le PBS. Ces dernières sont alors fixées avec 100 µl d'une solution de Paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 min à température ambiante puis rincées au PBS. La fixation des cellules permet de travailler sur un support fixe et immuable.

#### *2.2.6.3.2. Perméabilisation des cellules*

Une fois les cellules sont fixées, elles sont perméabilisées avec une solution de lyse pendant 3 min à température ambiante. Cette réaction facilitera l'entrée des anticorps dans la cellule et une perméabilisation douce qui n'entraîne pas une lyse totale des cellules. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et incubées avec 100µl d'une solution de lyse contenant du triton X100, pendant 3min, suivi d'un lavage au PBS.

#### *2.2.6.3.3. Immunomarquage avec l'anticorps primaire (Anti-γH2AX)*

Les cellules sont incubées pendant 40 min à 37°C avec 30 µl d'anticorps primaire γH2AX (anti-phospho-Histone H2AX, Ser 139, clone JBW301), dilué au 1 : 800 dans une solution de PBS-BSA 3% (**Fig.2.15-d**).

#### *2.2.6.3.4. Immunomarquage avec l'anticorps secondaire*

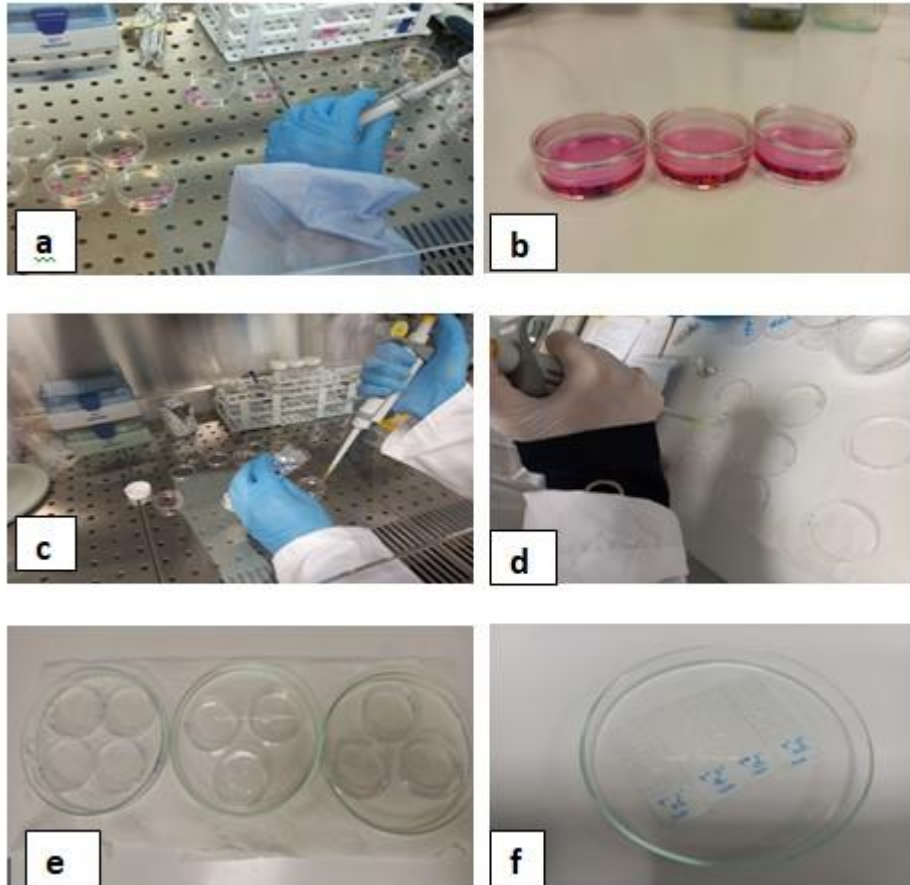
Après rinçage au PBS, une deuxième incubation des cellules avec l'anticorps secondaire (Anti-IgG de souris couplés Alexa Fluor® 488) couplé au fluorochrome FITC, dilué à 1 : 100 dans PBS-BSA 3%, pendant 20 min à 37°C et à l'obscurité.

Les lamelles contenant les cellules traitées sont rincées au PBS et montées à l'obscurité sur des lames nettoyées, contenant une goutte de Vectashield-DAPI (Vectashield Mounting with DAPI ; Vector Laboratoire Ref. H-1200). Le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) est un colorant qui se fixe spécifiquement sur l'ADN, quand il est excité en lumière violette (UV), il émet une fluorescence bleue et permet de visualiser la taille et la forme des noyaux des cellules. L'Alexa Fluor 488 est un fluorochrome utilisé pour le marquage, il restitue une



fluorescence verte. Il permet de détecter les cassures double brins sous forme de spots fluoresçant colorés en vert appelé « foci ».

Les bords des lames sont collés avec du vernis transparent et conservées à 4°C jusqu'à l'observation.

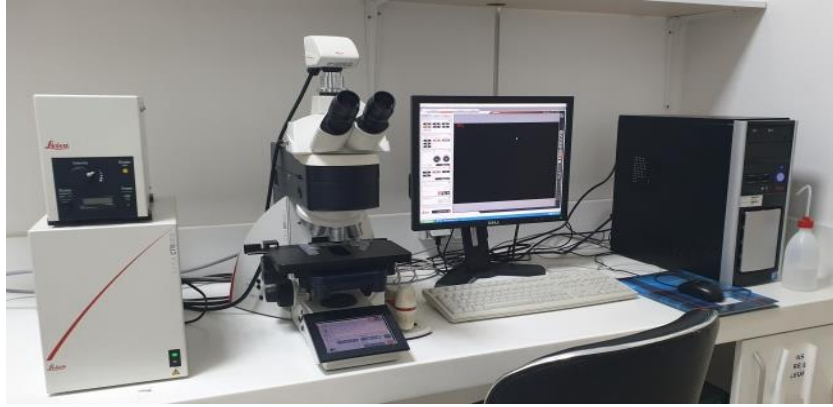


**Figure 2-15** : les étapes du marquage des foyers  $\gamma$ -H2AX

- a) Ensemencement des cellules sur les lamelles ; b) Mise en culture les cellules Vero dans les boîtes pétri ; c) Contact des cellules avec l'EBR ; d) Marquage des cellules avec anticorps primaire ; e) Lavage avec du PBS f) Montage des lamelles sur les lames

#### 2.2.6.3.5. Observation au microscope à fluorescence

Les observations sont effectuées au microscope à fluorescence (Leica DFC x345FX) au grossissement X400 par le mode à transmission avec la coloration DAPI, qui permet de bien définir la forme, la taille et l'aspect des noyaux des cellules (**Fig 2.16**). Un balayage en mode fluorescent permet d'évaluer les cassures double-brin qui apparaissent en faisant un balayage de toute la lame et les images sont obtenues à l'aide d'un logiciel Image (LAS V 3.6).



**Figure 2-16** : Photographie de microscope à fluorescence (Leica DFC x345FX)

### 2.2.7. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM et les comparaisons entre les moyennes ont été réalisées par le test ANOVA à un facteur. Les analyses ont fait appel au logiciel Graph Pad Prism8. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 :

- Si  $P \leq 0,001$  la différence est très hautement significative \*\*\*
- Si  $P \leq 0,01$  la différence est hautement significative \*\*
- Si  $P \leq 0,05$  la différence est significative\*
- Si  $P > 0,05$  la différence est non significative

# **Troisième chapitre :** **Résultats**

# Chapitre 3

## 3. RESULTATS

Dans notre démarche expérimentale, les cellules Vero au contact avec l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis L* ont été soumises à une dose d'irradiation de 2Gy qui correspond à la fraction administrée par séance de radiothérapie, afin de mettre en évidence l'éventuel effet radioprotecteur de cet extrait.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons réalisé un test MTT pour déterminer, d'une part la cytotoxicité de l'EBR sur cette lignée et évaluer d'autre part la viabilité cellulaire post-irradiation. Pour approfondir notre étude, on a procédé à l'analyse de l'apoptose radio-induite par cytométrie en flux et pour finir, nous avons détecté et localisé les cassures double brin de l'ADN induites par les radiations (DSB) via les foci  $\gamma$ -H2AX par microscopie à fluorescence après immuno-marquage.

### 3.1. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait brut par le test

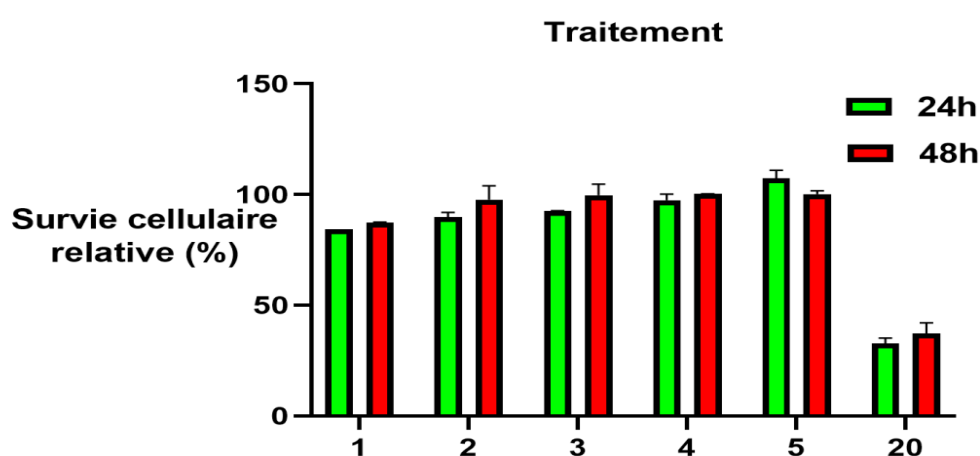
#### MTT

Les résultats représentant les moyennes d'absorbance des triplicatas de chaque concentration exprimée en pourcentage de viabilité cellulaire, après 24h et 48h d'incubation en fonction des différentes concentrations de l'EBR (**Fig.3.1**) révèlent que lorsque la lignée cellulaire Vero est incubée en présence de milieu seul (le contrôle négatif), exprime un taux de viabilité cellulaire de 100%.

Pour des concentrations de l'EBR variant de 1 à 5 mg/ml on observe un taux de viabilité allant de 75,10% à 107,58% ; et de 86,58% à 100,47% après respectivement 24h et 48h d'incubation. A l'exception de l'incubation avec une concentration d'EBR de 1 mg/ml durant 24 h (75.10 %) toutes les valeurs obtenues excèdent 80% de viabilité cellulaire.

De part ces résultats l'extrait de romarin n'a donc pas un effet significatif sur la viabilité ou la prolifération des cellules Vero. En revanche, à une concentration de 20 mg/ml on note un effet cytotoxique significatif traduit par une diminution du taux de survie pratiquement similaire après une mise en contact de 24h (30,55%) et 48h (33,44%).

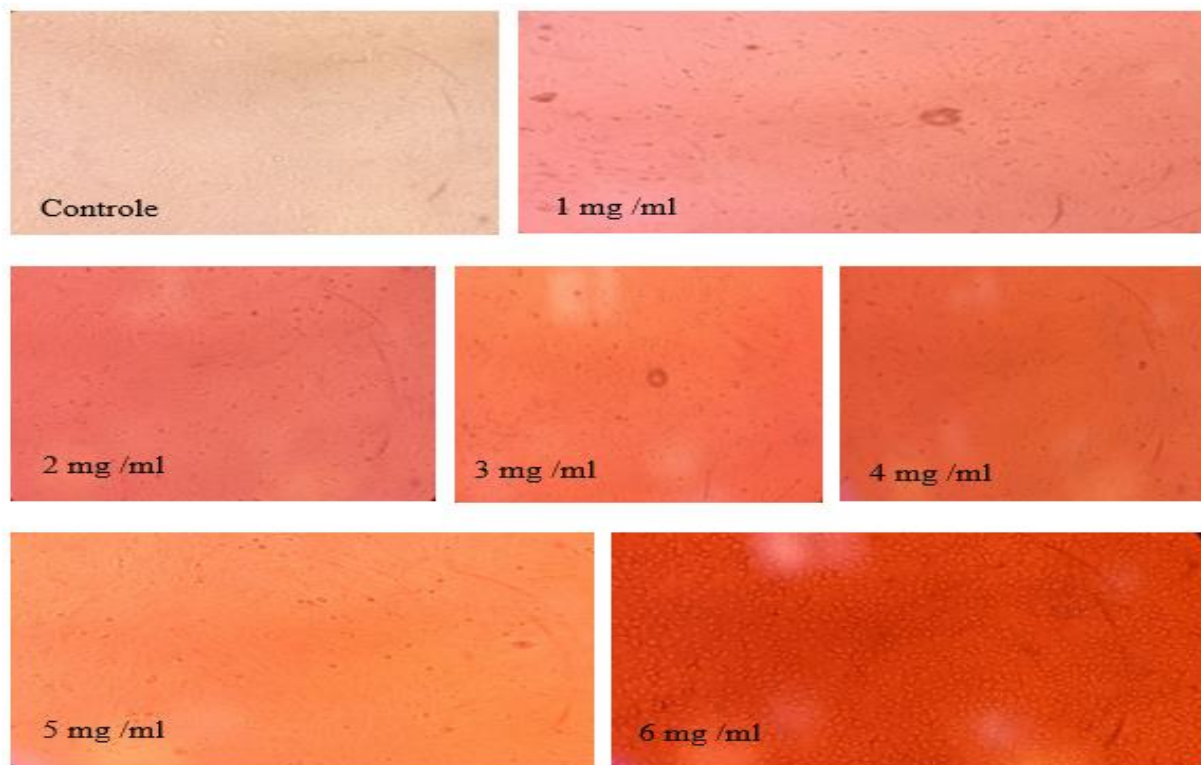
Par conséquent, l'EBR à une concentration précise induit l'inhibition après un certain temps d'incubation. En effet nos expériences précédentes montrent que les 50% d'inhibition de la prolifération cellulaire ( $IC_{50}$ ) sont induites à des concentrations de 13,08 mg/ml et 13,75 mg/ml, après respectivement 24h et 48h d'incubation.



**Figure 3.0.1 :** Histogramme montrant le taux de viabilité cellulaire en présence de différentes concentrations de l'EBR à des temps d'incubation de 24h et 48h

L'analyse statistique par ANOVA I a montré que les moyennes de viabilité cellulaire obtenues sont proches et comparables en considérant le paramètre temps d'incubation 24h et 48h ( $p > 0,05$ ) d'une part et la concentration de l'extrait brut d'autre part ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que l'EBR dans l'intervalle des concentrations étudié [1 à 5mg/ml] n'affecte pas la viabilité qu'elle que soit la durée d'incubation du moins pour 24 et 48 h et donc notre extrait brut ne manifeste pas une toxicité aux concentrations testées.

Par ailleurs, et afin d'évaluer au mieux, l'efficacité du traitement, nous avons analysé les images acquises par le microscope optique à contraste de phases inversées et estimé le nombre de cellules vivantes et leur aspect, en comparaison avec le contrôle non traité (**Fig.3.2**)



**Figure 3.2 :** photomicrographie des cellules Vero traitée avec des concentrations de 1-20 mg/ml d'EBR obtenues avec microscope optique à contraste de phase inversée (OLYMPUS K2) Gx400

Ainsi, après 24h d'incubation, l'observation morphologique des cellules Vero témoins présentent une forme fibroblastique typique des cellules Vero vivantes. Elles s'étalent uniformément en monocouche sur le support de culture formant ainsi un tapis cellulaire homogène et une bonne confluence avec un taux de viabilité de 100%. Après traitement avec les concentrations de l'EBR de 1 à 5mg/ml, les cellules ont montré de légères variations morphologiques médiées par l'extrait brut mais la majorité des cellules ont maintenu leurs caractéristiques (tapis cellulaire, forme cellulaire) qui restent comparables à celles des cellules non traitées (contrôle), avec une confluence de 75% à 100%.

Seules les cellules exposées à la concentration de 20 mg/ml ont développés une morphologie non adhérente décollée et arrondie laissant un vide entre les amas de cellules qui perdent la cohésion et le contact entre elles rappelant l'aspect des cellules mortes ce qui réduit le taux de viabilité.

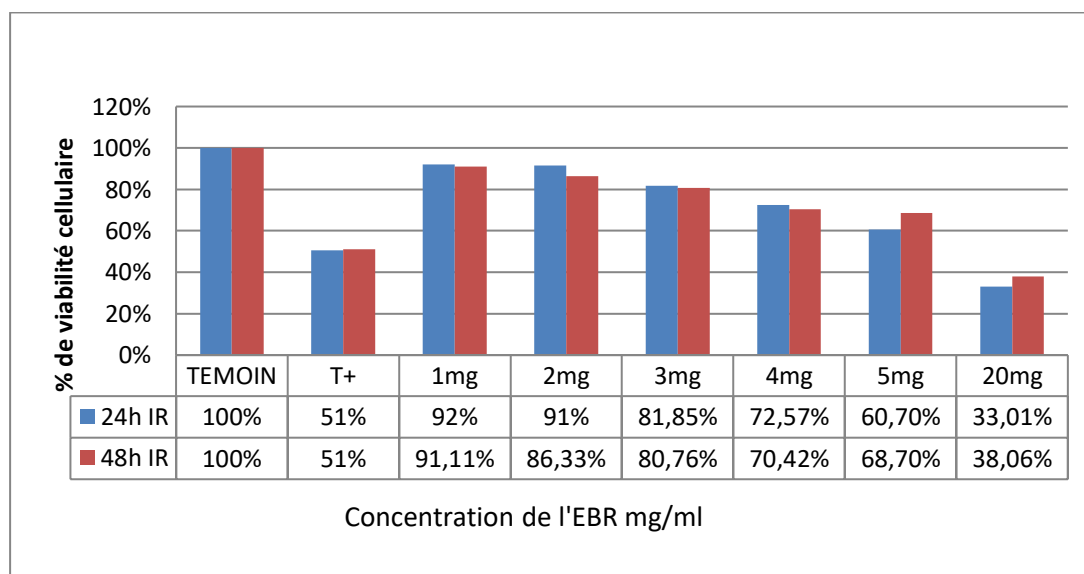
### 3.2. Evaluation du taux de survie des cellules post-irradiation

L'évaluation du pourcentage de survie des cellules Vero, préalablement traitées avec la gamme de concentration de l'EBR et après exposition à une dose de 2 Gy a été effectuée par le test MTT après 24h et 48h post irradiation.

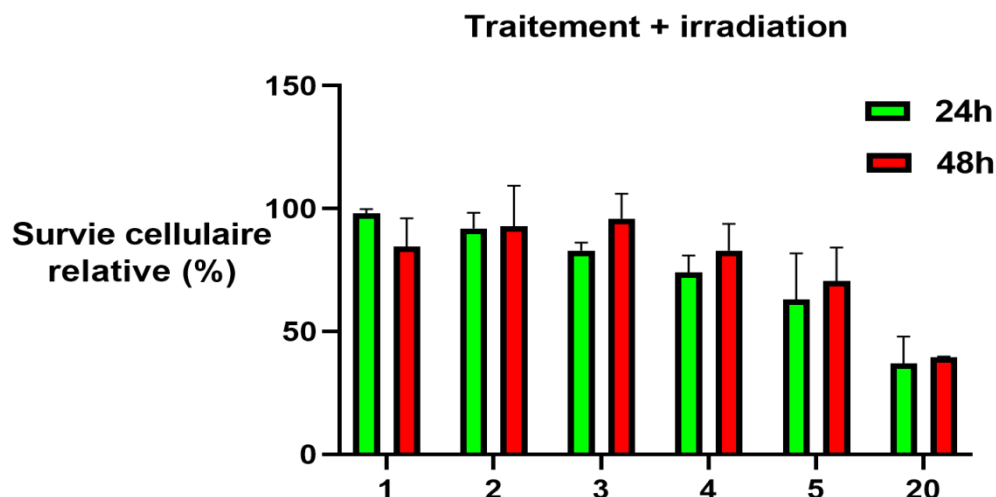
Le suivi du taux de survie cellulaire, représenté dans la Figure (**Fig.3.3**), montre que suite à l'irradiation en absence de l'EBR, les cellules prolifèrent beaucoup moins comparativement à celles de l'échantillon de contrôle et celles irradiées en présence de l'EBR (1-5mg/ml). En effet l'irradiation a provoqué la mort de la moitié des cellules représentée par un taux de survie cellulaire de 51% correspondant aux deux temps d'incubation à savoir 24h et 48h.

Nous constatons, que l'utilisation de l'EBR dans l'intervalle de [1 à 5mg/ml] a permis une prolifération plus importante que le contrôle dont le taux de survie est entre (92,16% et 60.7) ; (91,11% et 68.70%) après 24h et 48h d'incubation respectivement et que cet effet semble plus prononcé vers les faibles concentrations particulièrement à 1mg/ml. La concentration de 20 mg/ml d'EBR associé à l'irradiation affecte la viabilité cellulaire dès 24 d'incubation.

L'exposition des cellules à l'irradiation en présence de l'extrait brut du romarin a réduit le nombre des cellules Vero avec une valeur  $IC_{50}$  correspondant à 9,43mg/ml et de 12,81mg/ml après respectivement 24 et 48 heures.



**Figure 3.3 :** Représentation graphique des variations des taux de survie cellulaire (%) en fonction du traitement avec l'EBR post-irradiation



**Figure 0.4** : histogramme montrant le taux de viabilité des cellules traitées avec l'EBR seules et avec irradiation en présence de différentes concentrations de l'EBR après 24h

L'analyse statistique par ANOVA I a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes de viabilité obtenues par le traitement des cellules Vero avec l'EBR seule (test de cytotoxicité) et celles obtenues en associant l'EBR et l'irradiation ( $p > 0,05$ ). De même que la variation de la concentration de l'extrait brut ( $p > 0,05$ ) n'affecte pas ces valeurs. Notons que le taux de viabilité reste important lors de l'association de l'extrait brut à l'irradiation ce qui implique la protection des cellules par l'EBR contre les rayonnements donc son effet radioprotecteur.

L'observation morphologique (**Fig.3.5**) des cellules Vero irradiées en absence de l'EBR montre des espaces vides qui perturbent le tapis cellulaire, la présence de cellules mortes que l'on distingue par des formes arrondies réduit le taux de survie de moitié (51,15%) par rapport aux cellules témoins.





**Figure 3.5** : photomicrographie des cellules Vero irradiées après un traitement avec des concentrations de 1-20 mg/ml d'EBR obtenue avec microscope optique à contraste de phase inversée Gx400

Concernant les cellules irradiées en présence de l'EBR dans la gamme de concentration de 1 à 5mg/ml, après 24h d'incubation, la morphologie reste inchangée, les cellules n'ont pas été affectées sauf pour la concentration de 20 mg/ml, pour laquelle on observe un aspect arrondi des cellules et des débris tapissant le fond des puits avec un taux de viabilité réduit de (33,01% et 38,06%) après 24h et 48h respectivement.

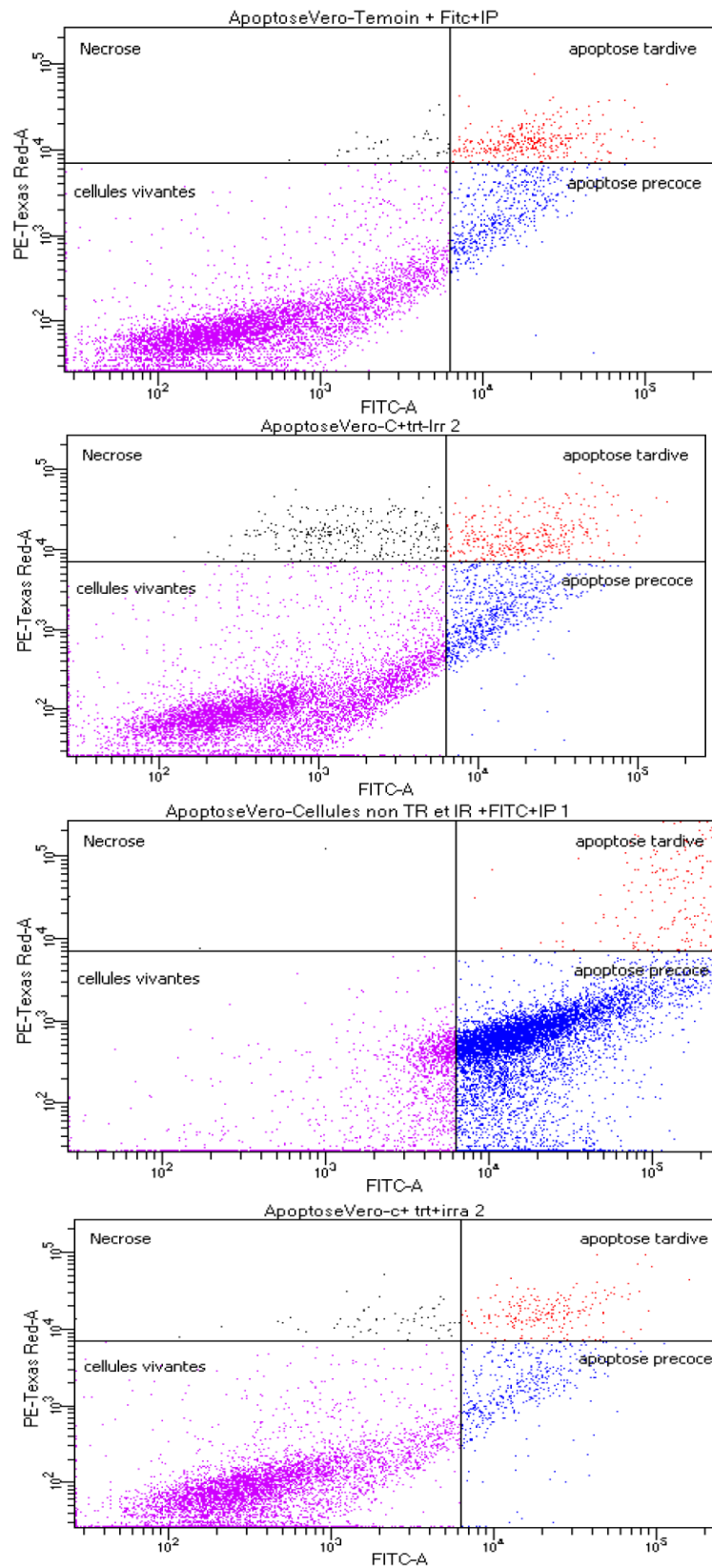
### 3.3. Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux

L'analyse par cytométrie en flux a été utilisée pour évaluer l'effet radioprotecteur de l'extrait brut du romarin. Soit son effet sur le taux d'apoptose de la lignée cellulaire Vero induit par les radiations.

Nous avons donc évalué l'effet de l'EBR seul, l'irradiation seule à 2Gy et l'effet combiné des deux traitements (EBR+ Irradiation).

Après 24 heures de traitement, les cellules ont été récupérées et l'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux après un double marquage à l'annexine V (FITC) et à l'iodure de propidium (IP).

Les résultats obtenus pour les différents échantillons sont représentés dans la figure **(Fig.3.6)** qui montre la distribution des différentes populations des cellules par rapport au marquage. Ainsi, nous distinguons quatre populations à savoir : **les cellules vivantes** Annexine (-) et IP (-), **les cellules apoptotiques précoces** annexine (+) et IP (-), **les cellules apoptotiques tardives** Annexines (+) et IP (+) et **les cellules en nécrose** Annexine ( $\pm$ ) et IP (+).



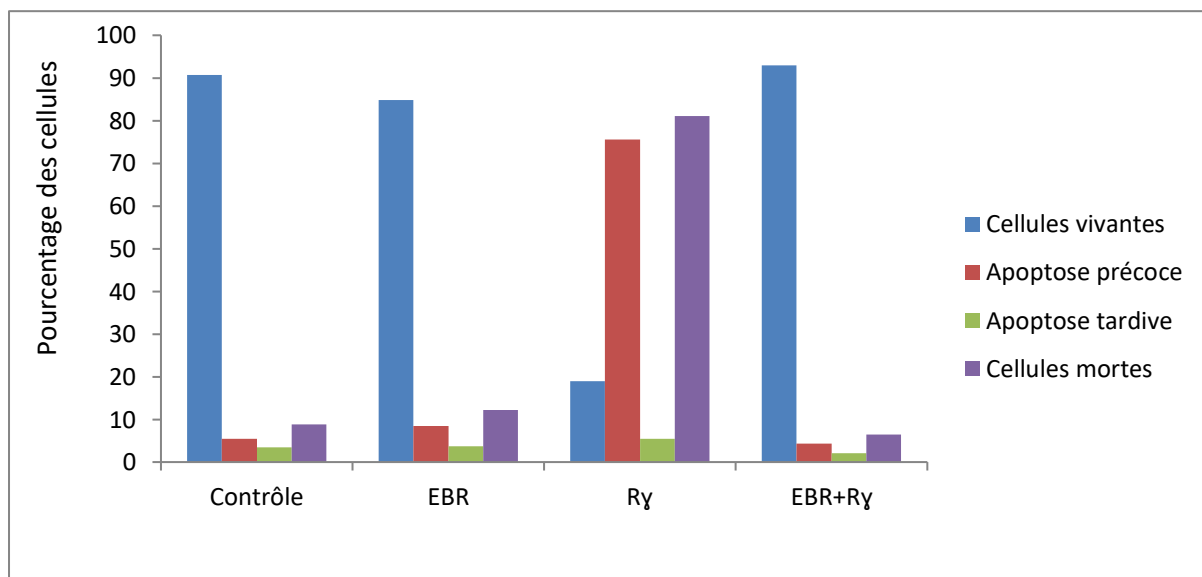
**Figure 3.6** : Dot plots multiparamétriques des différentes populations après traitement des cellules à l'EBR et/ou irradiation

On observe à travers les résultats résumés dans le tableau (**Tab3.1**) et présentés dans la figure (**Fig3.7**) un taux de cellules apoptotiques de 8.8% pour le contrôle et de 12.2% pour les cellules traitées à l'EBR.

**Tableau 3-1. :** Taux d'apoptose à différents traitements des cellules Vero

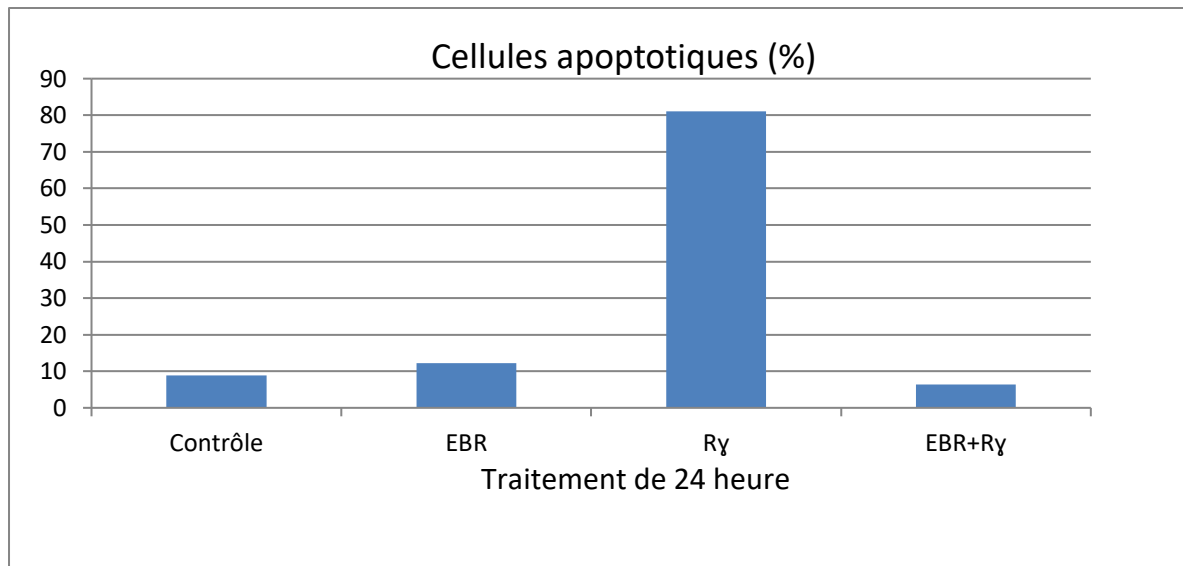
Paramètre	Contrôle	EBR	Irradiation	EBR+ Irradiation
Apoptose	8,8%	12,2%	81,1%	6,4%

Suite à l'irradiation des cellules à la dose de 2Gy, le pourcentage d'apoptose a augmenté de manière significative pour atteindre 81.1%. Un niveau élevé d'apoptose précoce a été observé dans les cellules irradiées non traitées 24 heures après l'irradiation (**Fig.3.7**). La présence de l'EBR a significativement diminué le pourcentage d'apoptose détecté dont le pourcentage est de 6,4%.



**Figure 3.7 :** Effets des traitements appliqués sur l'induction de l'apoptose des Vero

**EBR** : traitement des cellules à l'extrait brut du romarin, **R $\gamma$**  : irradiation gamma des cellules à 2Gy, **EBR + R $\gamma$**  : traitement à l'extrait brut du romarin des cellules 1heure avant exposition au rayonnement gamma.



**Figure 3-8 :** Taux d'apoptose induite par les différents traitements

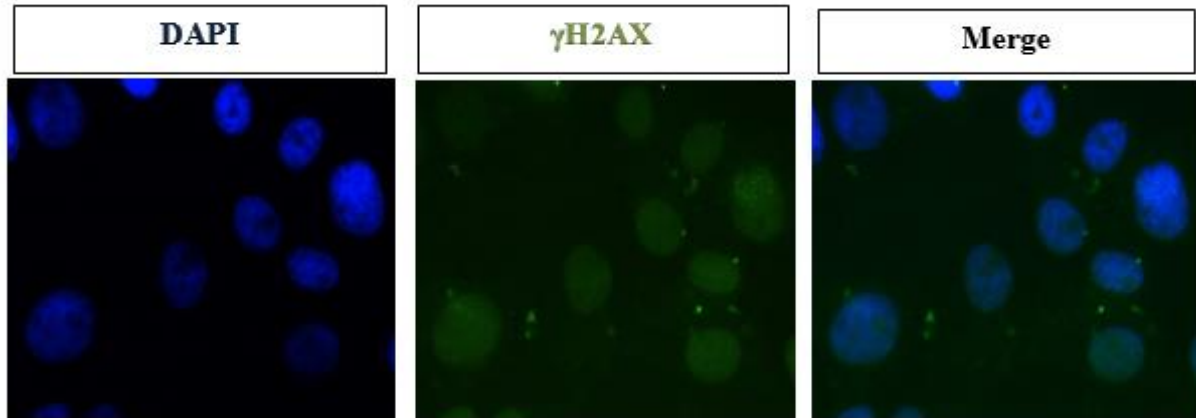
**EBR** : traitement des cellules à l'extrait brut du romarin, **R $\gamma$**  : irradiation gamma des cellules à 2Gy, **EBR + R $\gamma$**  : traitement à l'extrait brut du romarin des cellules 1heure avant exposition au rayonnement gamma

### 3.4. Détection des cassures doubles brin radio-induites par immunofluorescence

L'étude des cassures doubles brins radio-induite a été effectuées par l'observation des foyers  $\gamma$ H2A.X à partir d'images obtenues suite à immuno-marquages réalisés à différents temps d'incubation (1h, 4h et 24h), après traitement à l'extrait brut de romarin et irradiation à 2Gy.

L'immunofluorescence des formes phosphorylées de l'histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX) permet en effet de mettre en évidence les cassures double-brin (DSB) sous forme de spots fluorescents appelés *foci* à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Leica DFC x345FX).

La coloration nucléaire au DAPI des cellules non irradiées et non traitée (contrôle négatif) a montré, en général, un aspect régulier du contour des noyaux sans présence de fluorescence, témoignant d'une stabilité cellulaire (**Fig.3.8**)

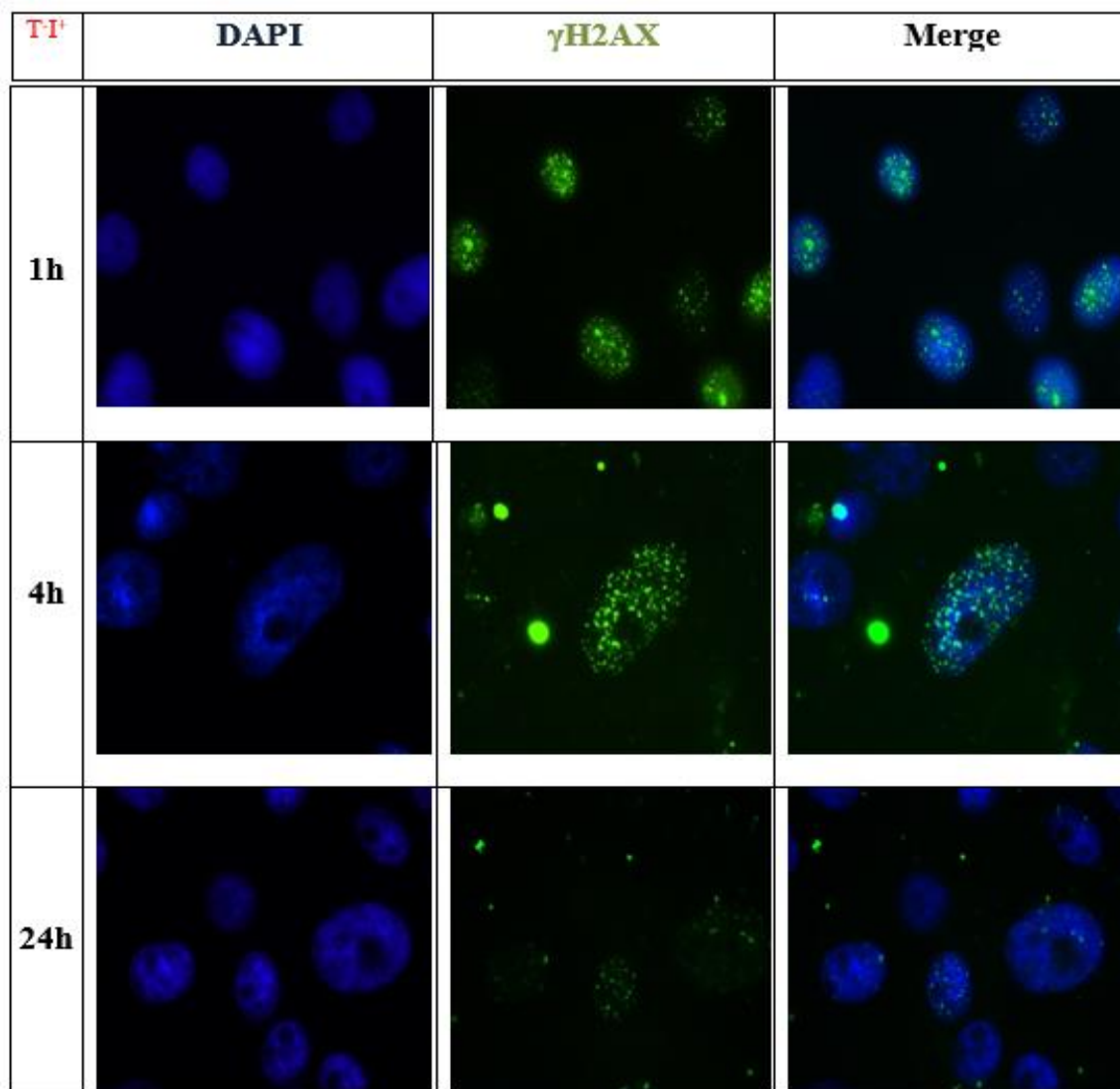


**Figure 3-9 :** Micrographie montrant représentant des noyaux colorés au DAPI , mode fluorescent  $\gamma$ -H2AX et le Merge des cellules Vero non irradiées et non traitées. Observation au microscope à fluorescence Gx 400 (Leica DFC x345FX)

Concernant le contrôle positif irradié à 2 Gy (**Fig.3.8**), la coloration au DAPI montre des noyaux altérés après 1 heure d'incubation. Ces noyaux présentent une forte fluorescence, signe de présence de nombreuse cassure double brin indénombrables.

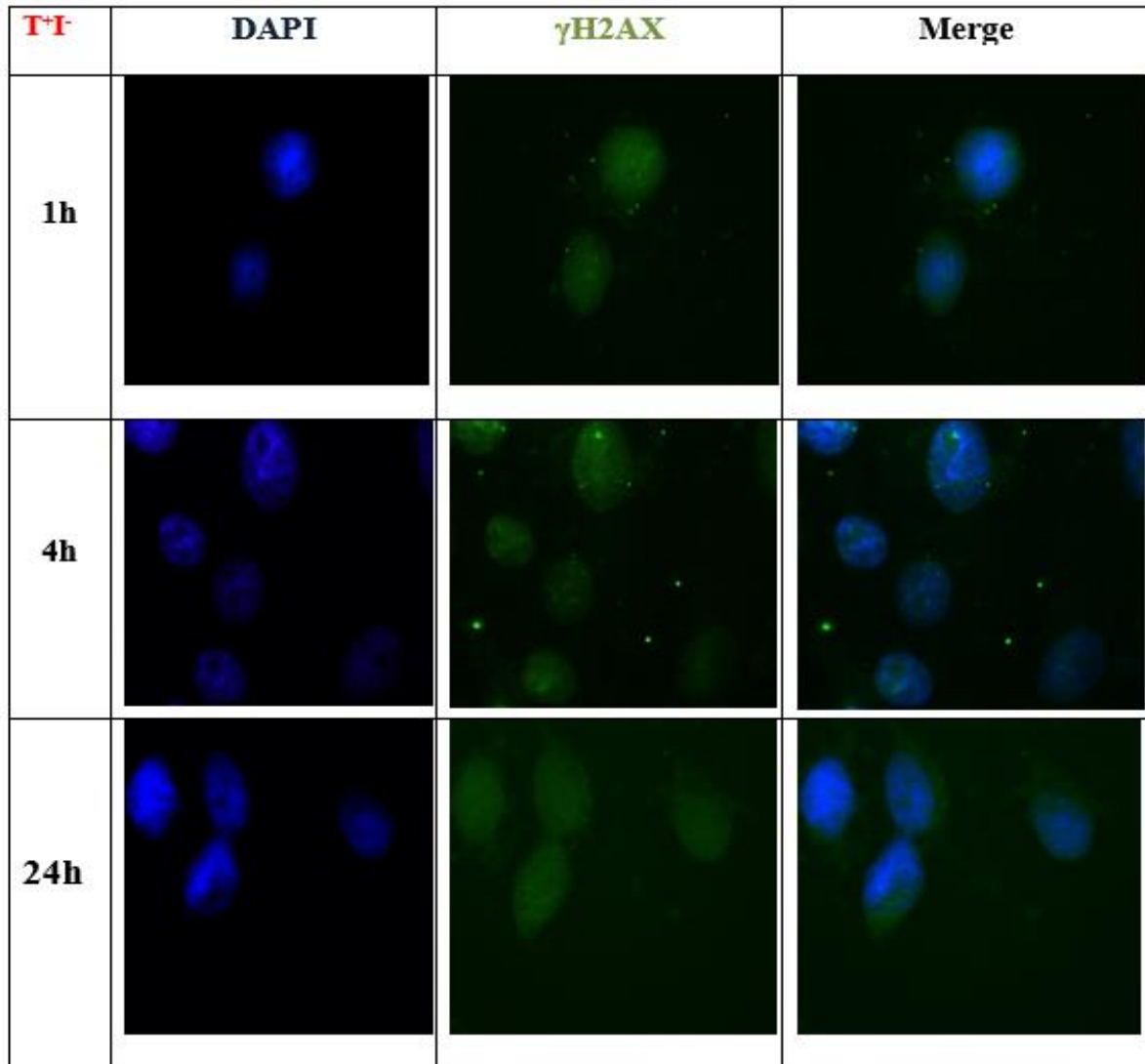
Après 4 heures, on obtient un ensemble de noyaux à aspect plus au moins altérés, avec présence de gros noyau (GN) caractéristiques de la mort mitotique radio-induite avec persistance des foci  $\gamma$ -H2AX.

Les résultats obtenus après 24 h d'incubation font état de présence de quelques gros noyaux caractéristiques de la mort mitotique radio-induite en mode DAPI et on note une atténuation de la fluorescence due probablement à la réparation des dommages radio-induits.



**Figure 3-10** : Micrographie montrant l'immunomarquage de  $\gamma$ -H2AX des cellules Vero non traitées et irradiées après 1h, 4h et 24h d'incubation. Observation au microscope à fluorescence Gx400 (Leica DFC x345FX).

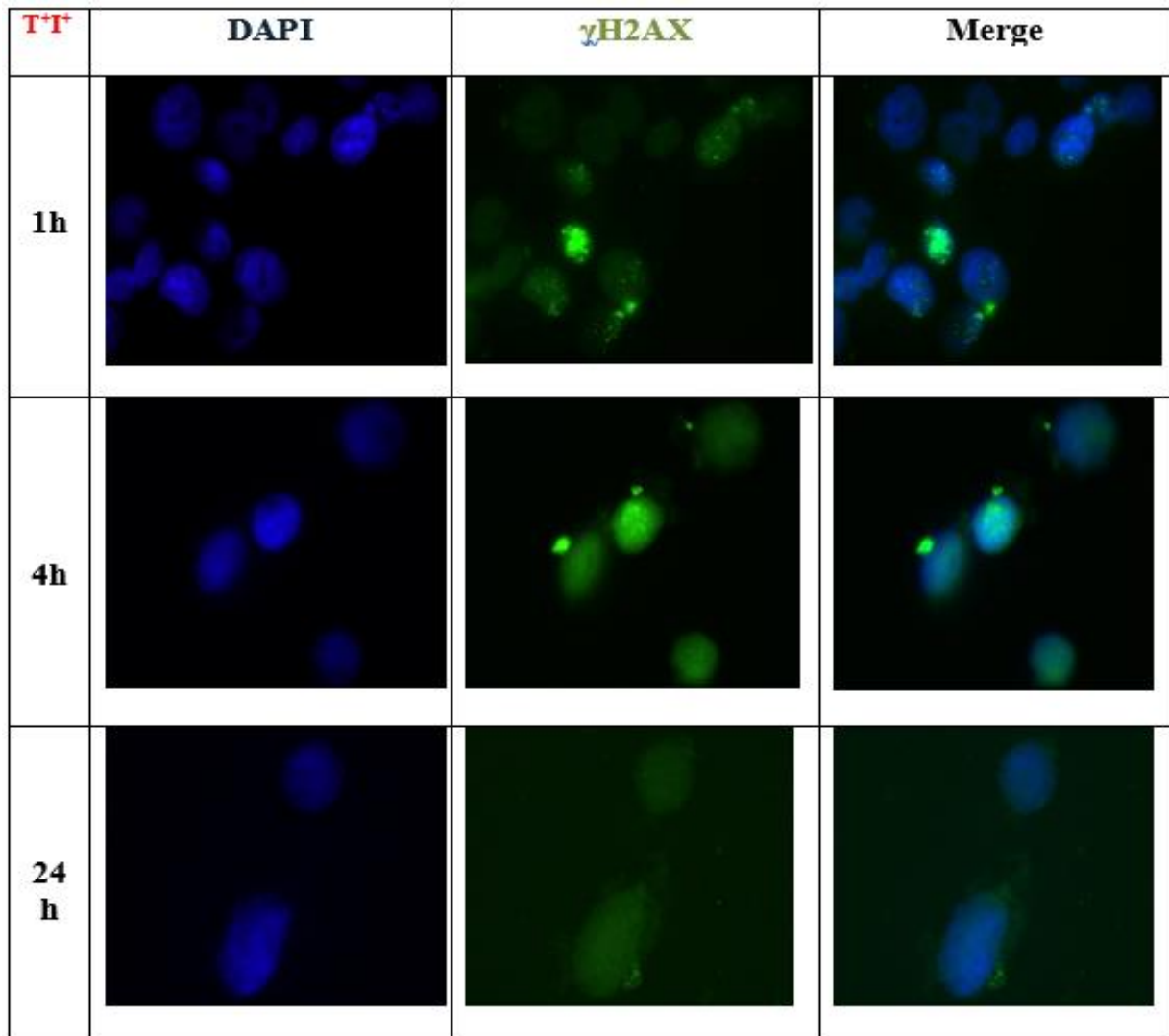
L'observation des cellules traitées avec l'extrait brut du romarin à raison de 1mg/ml, sans être irradiées (**Fig.3.10**), a montré un ensemble de noyaux à aspect régulier et dépourvue de fluorescence à tous les temps d'incubation témoignant de la non toxicité de l'extrait.



**Figure 3-11** : Micrographie montrant l'immunomarquage de  $\gamma$ -H2AX des cellules Vero traitées et non irradiées après 1h, 4h et 24h d'incubation. Observation au microscope à fluorescence Gx400 (Leica DFC x345FX).

Par contre, les cellules irradiées en présence de l'extrait brut du romarin (**Fig.3.11**), ont montrées dans l'ensemble un aspect régulier des noyaux à faible fluorescence avec une présence insignifiante de foci  $\gamma$ H2AX. Toutefois, on suspect la présence de micronoyaux (MN) après 4 heures (visible en mode fluorescent  $\gamma$ H2AX) résultants d'une mitose asymétrique ou anomalie de réparation chromosomique lors de la division.





**Figure 3-12 :** Micrographie montrant l'immunomarquage de  $\gamma$ -H2AX des cellules Vero traitées et irradiées après 1h, 4h et 24h d'incubation. Observation au microscope à fluorescence Gx400 (Leica DFC x345FX).

# **Quatrième chapitre : DISCUSSION**

# Chapitre 4

## 4. DISCUSSION

L'objectif de notre travail est de fournir un extrait de plante capable de moduler les lésions causées par les radiations ionisantes. Il a été rapporté que la présence d'un agent radioprotecteur dans l'organisme pendant l'irradiation permettait de réduire les effets drastiques des rayonnements, tels que la cancérogénicité et les effets héréditaires (**Chekiet al, 2016**).

Les dommages causés par la dispersion des rayonnements ionisants (rayons X) en interaction avec le système biologique sont dus principalement à la production d'agents chimiquement actifs tels que les radicaux libres (**Reiszet al, 2014**)

L'opinion dominante est que la consommation de substances naturelles contenant des antioxydants est capable de réduire le risque de lésions en piégeant les radicaux libres dans les systèmes biologiques (**Hosseinimehr et al, 2007 ; Xu D-P et al, 2017**).

Les effets radio-protecteurs des plantes contenant des antioxydants et des stimulants du système immunitaire ont été largement étudiés, et certains d'entre eux ont fait état d'un effet radio-protecteur (**Jagetia, 2007**).

Le romarin contient des composés tels que les diterpènes phénoliques, les acides caféiques et des flavonoïdes qui inhibent la peroxydation des lipides et les dommages oxydatifs de l'ADN et peuvent piéger les radicaux libres (**Hassani et al, 2016**).

Il était attendu donc que l'extrait brut du romarin présentera des effets de radioprotection contre les rayons gamma en tant qu'antioxydant naturel et piègeur de radicaux libres.

L'ajout de l'EBR aux cellules de la lignée des Vero n'a pas modifié la viabilité cellulaire par rapport à la viabilité déterminée dans les cellules témoins, montrant ainsi l'absence de cytotoxicité de notre extrait et ce dans la gamme de concentration testée pendant 24h et 48 h.

L'innocuité de l'EBR sur les cellules Vero a été démontrée par l'augmentation de la viabilité cellulaire dans la gamme de faibles concentrations.

Ces résultats concordent avec les travaux de **Ramachandran *et al***, qui ont montré que l'acide ursolique (un des composants du romarin), à de faibles concentrations, exprime un taux de viabilité très élevé sur les fibroblastes dermiques humains (**Ramachandran *et al* 2020**).

De même, (**Zhaeintan *et al*, 2022**) ont démontré que traitées avec de faibles concentrations d'huile essentielle de romarin, le taux de survie des lymphocytes périphériques humains était maximal, et qu'une diminution du taux s'observe en augmentant la concentration de cette huile.

Ce qui rejoint nos résultats en effet, on constate qu'à des concentrations élevées (20 mg/ml), l'EBR manifeste une toxicité significative (taux de viabilité cellulaire de 30,55 % et 33,44 % après 24 h et 48 h respectivement). Les données de la littérature suggèrent que les polyphénols, à des concentrations plus élevées, se comportent comme des pro-oxydants et peuvent induire l'apoptose (**Halliwell, 2008**). Et selon (**Inal *et al*, 2017**) les composés phénoliques possèdent les propriétés d'un antioxydant, par contre à des concentrations plus élevées, ils exercent un effet pro-oxydants.

Les concentrations non toxiques de l'EBR ont montré une capacité de protection accrue en augmentant la survie cellulaire lorsque les cellules étaient exposées à une dose de 2 Gy. Par conséquent, nous postulons que les composés du romarin peuvent contribuer aux effets photoprotecteurs.

L'acide carnosique et le carnosol sont les principaux composants actifs des extraits de romarin (**Frankel *et al*, 1996**). Ces diterpènes peuvent améliorer la capacité protectrice en raison de leur forte capacité à piéger les radicaux peroxydes lipidiques, lesquels causent des dommages à l'ADN et déclenchent des processus inflammatoires (**Xiang *et al*, 2013**).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par (**Zhaeintan *et al*, 2022 ; Jilani *et al*, 2024**) et qui ont démontré l'effet radioprotecteur de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. (R-EO) sur les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC), se manifestant par une augmentation notable de la survie cellulaire par rapport au groupe

témoin. De plus, les pourcentages d'apoptose et de nécrose dans les cellules ont diminué de manière significative lorsqu'elles ont été traitées avec R-EO, ce qui indique son potentiel en tant qu'agent radioprotecteur.

De même (**Wang *et al*, 2017**) ont constaté que l'acide ursolique, un puissant antioxydant, présentait un potentiel radioprotecteur sur les kératinocytes épidermiques humains (HaCaT). Cet acide a réduit les niveaux de ROS et de peroxydation lipidique, diminué les niveaux d'interleukine-6 et 1 $\beta$ , de facteur de nécrose tumorale alpha, et bloqué l'activité de liaison de l'ADN du NF-kB induite par les rayonnements gamma sur les cellules cutanées HaCaT.

D'autre part, (**Prades-Sagarra *et al*, 2023**) ont pu évaluer les propriétés radio protectrices de l'acide caféique (CAPE) sur les lignées cellulaires fibroblastiques de poumon.

Afin de mesurer l'effet radio protecteur de notre extrait sur la lignée cellulaire Vero, 1 mg/ml d'EBR a été utilisée comme concentration non toxique pour toutes nos analyses ultérieures.

La Cytométrie en flux a été utilisée pour quantifier et vérifier le nombre de cellules apoptotiques induites par l'irradiation des cellules Vero. L'Annexin V-FITC et la coloration PI ont été utilisées pour analyser le pourcentage de cellules apoptotiques des cellules traitées par irradiation en l'absence et en présence d'EBR.

Nos résultats indiquent que le traitement par rayonnement a augmenté la fraction de cellules positives à l'Annexin V-FITC/PI de manière significative, et a conduit à l'induction d'un pourcentage relativement élevé d'apoptose (81,1%) par rapport aux échantillons témoins (non irradiés) (8,8%). Ce mode de mort cellulaire suite à l'irradiation de cellules en culture a été rapporté par plusieurs auteurs pour différents types de cellules dont (**Ghoreia *et al*, 2005**).

L'observation des cassures doubles brin de l'ADN (DSB), qui déclenchent l'apoptose, ainsi que la relation linéaire entre les DSB et l'apoptose, suggèrent fortement que les dommages à l'ADN induits par les radiations sont impliqués dans l'induction de l'apoptose.

Il est bien établi que les rayonnements faiblement ionisants, tels que les rayons X et gamma, produisent des effets biologiques principalement de façon indirecte notamment la

formation de radicaux libres. Une grande partie des ruptures simples et doubles brins dans les molécules d'ADN est causée par la formation de radicaux hydroxyles.

La présence de 1 mg/ml d'EBR a entraîné une diminution significative de l'apoptose après irradiation  $\gamma$ , avec seulement 6,4 % de cellules apoptotiques.

Lorsque les cellules Vero ont été traitées avec l'EBR seul, aucun changement significatif n'a été observé dans les cellules positives à l'Annexin V-FITC/PI (12,2 %) par rapport au contrôle.

Ces résultats suggèrent que les radiations favorisent la mort cellulaire apoptotique et que l'apoptose induite par les radiations peut être inhibée par un prétraitement à l'EBR. Par conséquent, la réduction du pourcentage d'apoptose dans la lignée cellulaire Vero pourrait être attribuée à l'effet radio protecteur de l'extrait brut de romarin (EBR).

Nos résultats indiquent que l'EBR augmente la survie et diminue le pourcentage d'apoptose dans la lignée cellulaire Vero irradiée par les rayons gamma. Suggérant ainsi la capacité de l'EBR à protéger les Vero irradiés en piégeant les radicaux libres.

La majeure partie de l'activité antioxydante du romarin est attribuable à des diterpènes phénoliques tels que l'acide carnosique, le carnosol, le rosémanol, l'isoruzmanol, le rosémial et l'épiruzmanol, qui agissent comme des interrupteurs du stress oxydatif. La caféine et les aux flavonoïdes associés (**Oliveira et al, 2019**) confère également au romarin des propriétés anti oxydantes.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Tingting et al, 2020**), qui montrent que l'acide rosmarinique supprime l'apoptose de la glande parotide induite par les radiations en réduisant fortement l'expression de p-JNK, p-cJun, p53, Bax et Caspase-3, tout en augmentant l'expression de Bcl-2 et MDM-2 (**Zhang et al, 2020**). En effet, parmi les caspases, la caspase-3 a été impliquée dans l'apoptose induite par les radiations (**Fuchs et al, 1997**).

Des études antérieures ont révélé que les ROS activent l'apoptose en modulant l'expression de différentes protéines associées à l'apoptose. La surproduction de ROS active le p53 et JNK/c-JUN et inhibe MDM2. p53, en tant que gardien du génome, ceci peut déclencher l'apoptose lorsque l'ADN des cellules est endommagé et ne peut pas être réparé.

La plupart des facteurs apoptotiques dépendent de la régulation de p53 (**Zhang et al, 2020**).

**Jin et al. (2015)** ont suggéré que le prétraitement par l'acide caféique (AC), un des composés phénoliques du romarin, pourrait être efficace pour traiter les lésions intestinales induites par l'irradiation aux rayons X dans des modèles murins. Après 72 heures d'exposition aux radiations, une réduction significative de l'apoptose de la muqueuse intestinale et du stress oxydatif ont été observée chez les souris prétraitées avec de l'AC.

Il a été démontré que l'acide chlorogénique est capable de réduire la mortalité dans des modèles animaux après une exposition à l'irradiation  $\gamma$  (**Hosseinimehr et al, 2008**). De plus, l'acide chlorogénique diminue les dommages radio-induits de l'ADN dans les lymphocytes (**Cinkilic et al, 2013**).

**Fernando et al, (2016)** ont démontré dans les kératinocytes humains que l'acide rosmarinique est capable d'augmenter l'expression et l'activité de plusieurs enzymes habituellement réduites par le rayonnement UVB, telles que la superoxyde dismutase et la catalase. Ces données indiquent que l'acide rosmarinique peut fournir une cytoprotection substantielle contre les effets néfastes du rayonnement UVB en modulant les systèmes antioxydants cellulaires (**Fernando et al, 2016 ; Altomare et al, 2022**).

Pour vérifier si la réduction de l'apoptose exercée par l'EBR était due à un effet génoprotecteur de l'EBR, l'immunofluorescence a été réalisée comme technique sensible pour détecter les dommages radio-induits de l'ADN, en analysant les foyers de  $\gamma$ H2A.X associés aux cassures double-brin (CDB) (**Sánchez-Marzo et al, 2020 ; Smith et al, 2017**).

Parmi les nombreux dommages radio-induits de l'ADN, les cassures double-brin sont aujourd'hui considérées comme les lésions principales de l'effet des radiations ionisantes (**Lobrich et al, 2005 ; Rothkamm et al, 2003**). Il est bien établi depuis un certain temps que les cassures induisent la formation de  $\gamma$ H2AX et une plateforme de réponse aux dommages de l'ADN (DDR) englobant une large région du génome voisin, dans laquelle les facteurs de réparation sont concentrés et la transcription est réprimée (**Patrick et al, 2020 ; Cadet et al, 2015**). De plus, il a été élucidé que l'ATM phosphoryle H2AX en réponse aux cassures double-brin (DSB) (**Burma et al, 2001**).

Dans notre étude, l'intensité des foyers de  $\gamma$ H2A.X par noyau a atteint un pic, une heure après l'exposition de nos cellules aux rayonnements gamma à 2 Gy. En 24 heures post

irradiation l'intensité des foyers de  $\gamma$ H2A.X au sein des noyaux a diminué de plus de 90 %. Cependant, certains foyers de  $\gamma$ H2A.X sont encore observables à 4 heures.

Le prétraitement par l'EBR a entraîné des réductions significatives des cassures double-brin (CDB) dès la première heure post-irradiation, comme indiqué par des noyaux dépourvus de fluorescence à tous les temps d'incubation, ce qui a été corroboré par le faible pourcentage de H2AX phosphorylé, réduisant ainsi l'incidence des dommages de l'ADN dans les Vero.

La présence de l'EBR a donc engendré un effet positif sur la lignée cellulaire Vero en diminuant leur sensibilité aux rayonnements ionisants. En effet, on attribue à la famille des Lamiaceae une capacité radioprotectrice, dont les mécanismes comprennent principalement le piégeage des radicaux libres, la protection contre les lésions de l'ADN, la diminution de la peroxydation des lipides et l'augmentation des niveaux d'activité des enzymes glutathion, superoxydedismutase, catalase et phosphatase alcaline (**Adamczak et al, 2020**).

Selon **Alcaraz et al, (2014)** parmi les 10 composés antioxydants étudiés en tant que candidats radioprotecteurs contre les dommages chromosomiques causés par les rayonnements ionisants, l'acide rosmarinique, l'acide carnosique, le  $\delta$ -tocophérol (vitamine E) et l'apigénine ont présenté les effets les plus importants. De nombreuses plantes de la famille des Lamiacées, utilisées comme herbes culinaires, ont fait l'objet d'études sur leurs propriétés radioprotectrices sur les cultures cellulaires.

Ainsi, **Calo et al, (2015)** ont testé un extrait de *Thymus vulgaris*, appartenant à la famille des Lamiacées, sur des kératinocytes irradiés par des UV(A) ou des UV(B) ; ils ont constaté une diminution des bris de brin (SB), mais aucun effet sur les micronoyaux (MN) ou les foyers  $\gamma$ -H2AX.

Un effet protecteur similaire a été rapporté par **Cornaghi et al, (2016)** dans un modèle de peau humaine exposée aux UV(B). Un extrait de citron et de romarin (à une concentration élevée) a diminué la fréquence des MN induits par les rayons X dans les lymphocytes humains, et a diminué les cassures de brin (CB) induits par les UV(B) dans les kératinocytes (**Perez-Sanchez et al, 2014**).



Ce dernier groupe a également testé l'extrait de mélisse sur des kératinocytes irradiés aux UV(B) et a constaté une diminution des CB (quoi qu'à une concentration élevée) et des foyers  $\gamma$ -H2AX à une concentration plus modérée.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

L'objectif de l'utilisation d'agents radio protecteurs, atténuateurs et thérapeutiques ne se limite pas à la protection de l'homme contre les effets nocifs des rayonnements ionisants, mais aussi à l'amélioration de l'efficacité des rayonnements en médecine.

Cette étude a été consacrée à l'évaluation de l'activité cytotoxique et du potentiel radio protecteur de l'extrait brut de romarin (EBR) sur les Vero irradiées aux rayonnements gamma. L'activité cytotoxique in vitro de l'extrait a été explorée en utilisant la lignée cellulaire Vero, isolée à partir de cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain, par un test colorimétrique (MTT). L'administration de l'EBR à ces cellules a montré une absence de cytotoxicité, démontrant ainsi l'innocuité de l'EBR vis-à-vis de la lignée Vero.

Par ailleurs, nous avons démontré qu'un traitement combiné (EBR et rayonnements gamma) entraînait une nette augmentation du taux de survie des cellules post-irradiation, notamment pour la concentration de 1 mg/ml, laissant entrevoir une atténuation des dommages et donc l'effet radioprotecteur recherché. Pour mieux apprécier les résultats obtenus lors du traitement combiné, nous avons procédé à l'analyse de l'apoptose radio-induite par cytométrie en flux, révélant que la présence de l'EBR diminuait significativement le pourcentage d'apoptose détecté, confirmant ainsi l'effet radio protecteur de l'EBR.

Enfin, pour vérifier si la réduction de l'apoptose exercée par l'EBR était due à un effet génoprotecteur, nous avons réalisé une immunofluorescence comme technique sensible pour détecter les dommages à l'ADN, en observant les  $\gamma$ H2AX associés aux cassures double-brin (CDB). Le prétraitement par l'EBR a entraîné des réductions significatives des cassures double-brin (CDB). Par conséquent, l'EBR a engendré un effet positif sur la lignée cellulaire Vero en diminuant leur sensibilité aux rayonnements ionisants.

Ces résultats suggèrent donc que l'extrait brut de romarin comme radioprotecteur se place dans une perspective thérapeutique intéressante. L'ensemble de nos résultats corrobore ceux de la littérature mais doit néanmoins être approfondi par d'autres études plus poussées.

## Références bibliographiques

Adamczak, A., & Ożarowski, M. (2020). Radioprotective Effects of Plants from the Lamiaceae Family. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 20, 1–23.

Aliper, A. M., Bozdaganyan, M. E., Sarkisova, V. A., Veviorsky, A. P., Ozerov, I. V., Orekhov, P. S., Korzinkin, M. B., Moskalev, A., Zhavoronko, A., & Osipov, A. N. (2020). <Radioprotectors.org >.: an open database of known and predicted radioprotectors. *AGING*, 12(15).

Alcaraz-Sura, M., Gyngiri, A. D., Olivares, A., Lopez-Morata, J. A., & Castilo, J. (2014). Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells. *Anticancer Research*, 34(4), 1913-1921.

Altomare, A., Fiore, M., D’Ercole, G., Imperia, E., Nicolosi, R. M., Della Posta, S., Pasqua, G., Cicala, M., De Gara, L., Ramella, S., & Guarino, M. P. L. (2022). Protective Role of Natural Compounds under Radiation-Induced Injury. *Nutrients*, 14(24), 5374.

Andreassen, C.N. ; Grau, C. ; Lindegaard, J.C. (2003). Radioprotection chimique : un examen critique de l’amifostine en tant que cytoprotecteur en radiothérapie. *Semin. Radiat. Oncol.* 2003, 13, 62 à 72

Azmoonfar, R., Amini, P., Saffar H., et al., (2020). “Celecoxib a selective COX-2 inhibitor mitigates fibrosis but not pneumonitis following lung irradiation: a histopathological study,” *Current Drug Therapy*, vol. 15, no. 4, pp. 351–357, 2020

Baatout, S. (Ed.). (2023). *Radiobiology Textbook*. <[https://doi.org/10.1007/978-3-031-18810-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-18810-7_1)>.

Baron, L. (2022). *Les Rayonnements Ionisants*. <<https://www.kaptitude.com/les-rayonnements-ionisants>>.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 276, 42462–42467.

Candéias, S.M. ; Mika, J. ; Finnon, P. ; Verbiest, T. ; Finnon, R. ; Brown, N. ; Bouffler, S. ; Polanska, J. ; Badie, C. (1017). Les rayonnements à faible dose accélèrent le vieillissement du répertoire des récepteurs des lymphocytes T chez les souris CBA/Ca. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017, 74, 4339 à 4351.

Calo, R., Visone, C.M., & Marabini, L. (2015). Thymol and thymus vulgaris L. Activity against uva- and uvb-induced damage in nctc 2544 cell line. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 791, 30–37.

Cheki, M., Mihandoost, E., Shirazi, A., & Mahmoudzadeh, A. (2016). Prophylactic role of some plants and phytochemicals against radio-genotoxicity in human lymphocytes. *J Can Res Ther*, 12(4), 1234–1242.

Cinkilic, N., Cetintas, S.K., Zorlu, T., Vatan, O., Yilmaz, D., Cavas, T., Tunc, S., Ozkan, L., & Bilaloglu, R. (2013). Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. *Food Chem. Toxicol.*, 53, 359–363.

Collins, P. L., Purman, C., Porter, S. I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K. E., ... Oltz, E. M. (2020). DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nature Communications*, 11, 3158.

Cornaghi, L., Arnaboldi, F., Calo, R., Landoni, F., Baruffaldi Preis, W.F., Marabini, L., & Donetti, E. (2016). Effects of UV rays and thymol/Thymus vulgaris L. extract in an ex vivo human skin model: Morphological and genotoxicological assessment. *Cells Tissues Organs*, 201, 180–192.

Cressier, D. (2010). Synthèse et Evaluation de Nouveaux Dérivés Organiques et Organométalliques Contre les Effets des Rayonnements Ionisants. Thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Chimie-Biologie-Santé.

De Oliveira, JR., Camargo, SEA., De Oliveira, LD. (2019). Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*, 26(5).

De Ruyscher, D., Niedermann, G., Burnet, N.G., Siva, S., Lee, A.W.M., Hegi-Johnson, F. (2019). Toxicité de la radiothérapie. *Révérend Nat. Dis. Prim.* 2019, 5, 13.

Dowlath MJH, Karuppanan SK, Sinha P, Dowlath NS, Arunachalam KD, Ravindran B, Chang SW, Nguyen-Tri P, Nguyen DD. (2021). Effects of radiation and role of plants in radioprotection: A critical review. *Science of The Total Environment*, 779, 146431.

Du, J., Zhang, P., Cheng, Y., Liu, R., Liu, H., Gao, F., Shi, C., Liu, C. (2020). General principles of developing novel radioprotective agents for nuclear emergency. *Radiation Medicine and Protection*, 1, 120–126.

Dubois, C. (2017). Approche intégrée des dommages des rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis elegans* : de l'ADN aux protéines. Université de Montpellier. ISRN/IRSN-2018/206

Emamgholizadeh Minaei, S., Hosseini, F. (2021). The Role of Radioprotector Agents in the Protection of Normal tissue. *Journal of Research in Applied and Basic Medical Sciences*, 7(3), 161-171.

Fernando, P.M., Piao, M.J., Kang, K.A., Ryu, Y.S., Hewage, S.R., Chae, S.W., Hyun, J.W. (2016). Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells. *Biomol. Ther.*, 24, 75–84.

Frankel, E.N., Huang, S.-W., Aeschbach, R., Prior, E. (1996). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 131–135. doi: 10.1021/jf950374p.

Freneau, A. (2018). Etude comparative des effets moléculaires et cellulaires induits par des rayonnements X de différentes énergies. Université de Paris Saclay. NNT : 2018SACLS350ff. fftel-02089152

Fuchs, E.J., McKenna, K.A., Bedi, A. (1997). p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32 $\beta$ . *Cancer Res.*, 57, 2550-2554.

Ghoreia, P.H., & Mozdarani, Sh. Akhlaghpour. (2005). Effect of famotidine on radiation induced apoptosis in human peripheral blood leukocytes. *Iran. J. Radiat. Res.*, 3(1), 31-36.

Hassani, F.V., & Haliwell, B. (2016). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 389(9), 931–949.

Hassani FV, Shirani K, Hosseinzadeh H. (2016). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* .2016;389(9):931–49. doi: 10.1007/s00210-016-1256-0

Haritwal, Teena, Mrinalini Tiwar, & Paban K. Agrawala. (2022). Herbal Radioprotectors: A mini-review of the Current Status. *Natural Resources for Human Health*, 2, 274–286.

Hosseinimehr, S.J., Zakaryae, V., Ahmadi, A., & Akhlaghpour, S. (2008). Radioprotective effects of chlorogenic acid against mortality induced by gamma-irradiation in mice. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 30, 13–16.

Huguet, F. (2010) Étude de l'altération de la réponse aux radiations ionisantes par deux inhibiteurs de tyrosine kinase : le STI571 (Glivec®) et le BIBW 2992. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université Paris Sud - Paris XI. NNT : tel-00574782

Ibáñez, B., Melero, A., Montoro, A., Merino-Torres, J. F., Soriano, J. M., & San Onofre, N. (2023). A Narrative Review of the Herbal Preparation of Ayurvedic, Traditional Chinese, and Kampo Medicines Applied as Radioprotectors. *Antioxidants*, 12, 1437.

Jagetia, G. C. (2007). Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. *J Clin Biochem Nutr*, 40(2), 74–81. doi: 10.3164/jcbn.40.74

Jin, L. G., Chu, J. J., Pang, Q. F., Zhang, F. Z., Wu, G., Zhou, L. Y., Zhang, X. J., & Xing, C. G. (2015). Caffeic acid phenethyl ester attenuates ionize radiation-induced intestinal injury through modulation of oxidative stress, apoptosis and p38MAPK in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 40, 156–163.

Kamran, M. Z., Ranjan, A., Kaur, N., Sur, S., & Tandon, V. (2016). Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Medicinal Research Reviews*, 36(3), 461–493.

Khurana, H., Hazari, P. P., Mishra, A. K. (2019). Radioprotective efficacy of GSH based peptidomimetic complex of manganese against radiation induced damage: DT(GS)2Mn (II). *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 145, pp. 161–174, 2019.

Krishna N. Mishra, Belal A. Moftah, Ghazi A. Alsbeih. (2018). Appraisal of mechanisms of radioprotection and therapeutic approaches of radiation countermeasures. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 610–617.

Leite, S. (2017) Effets des rayonnements ionisants sur des biomolécules en solution : vers une caractérisation des dommages à l'échelle moléculaire. Université Paris13. NNT: 2017USPCD025ff. fftel-01891580v2

Leplat, M. (2017). Le romarin, *Rosmarinus officinalis L.*, une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. Aix Marseille Université. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01550355.

Liu, L., Liang, Z., Ma, S., Li, L., Liu, X. (2023). Radioprotective countermeasures for radiation injury (Review). *Molecular Medicine Reports*, vol. 27, no. 3, Article ID 66, 2023.

Lobrich, M., Rief, N., Kuhne, M., Heckmann, M., Fleckenstein, J., Rube, C., et al. (2005). Formation et réparation in vivo des cassures double brin d'ADN après des examens de tomodensitométrie. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 8984-8989.

Luce, Andrey. (2008) Implication des voies des récepteurs de mort dans les effets cibles et non cibles des radiations ionisantes. Université de Paris XI

Mashhadi Akbar Boojar M. (2020) An Overview of the Cellular Mechanisms of Flavonoids Radioprotective Effects. *Adv Pharm Bull*. 2020 Jan;10(1):13-19. doi: 10.15171/apb.2020.002.

Maier, P., Wenz, F., Herskind, C. (2014). Radioprotection des cellules tissulaires normales. *Strahlenther. Und Onkol*. 2014, 190, 745 à 752.

Mwalimu R. J., Azhagu S B. P. (2024). Review Of Phyto-Medical Extracts' And Compounds' Anti-Radiation Properties. Review Article *innovare Academic Sciences* : <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2024v17i5.50248>

Muhammad, N., Usmani, D., Tarique, M., Naz, H., Ashraf, M., Raliya, R., Tabrez, S., Zughaihi, T.A., Alsaieedi, A., Hakeem, I.J. (2022). Le rôle des produits naturels et leur approche multiciblée pour traiter le cancer solide. *Cellules* 2022, 11, 2209.

Mohammad Y. Alshahrani, Essam H. Ibrahim. (2022). Gold nanoparticles (AuNPs) and Rosmarinus officinalis extract and their potentials to prompt apoptosis and arrest cell cycle in HT-29 colon cancer cells. *Journal of King Saud University – Science* Volume 34, Issue 8, November 2022, 102304.

Musa, A. E., Shabeeb, D., Okoro, N. O. E., Agbele. A. T. (2020). Radiation protection by Ex-RAD: a systematic review, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 27, pp. 33592–33600, 2020

Painuli, S., Kumar, N. (March 2016) Prospects in the development of natural radioprotective therapeutics with anti-cancer properties from the plants of Uttarakhand region of India. 10.1016/j.jaim.2015.09.001.

Parham, S., Kharazi, A.Z., Bakhsheshi-Rad, H.R., Nur, H., Ismail, A.F., Sharif, S., Rama Krishna, S., Berto, F. (2020). Propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et antivirales des matières végétales. *Antioxydants* 2020, 9, 1309.

Perez-Sanchez, A., Barrajon-Catalan, E., Caturla, N., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Alcaraz, M., & Micol, V. (2014). Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 136, 12–18.

Petiot, E. (2009). Procédés de cultures de cellules VERO en milieu sans sérum : contributions au développement d'une stratégie PAT. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. Français. NNT : 2009INPL071N. tel-01748915.

Pham, T. C. V. (2011). Évaluation de la fréquence des micronoyaux et du potentiel clastogène et/ou aneugène du benzo-a-pyrène suite à une exposition in vitro des lymphocytes humains. Université de Montréal.

Pouthier, T. (2006). Mise en évidence de cassures double brin de l'ADN induites par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha. Université Bordeaux I. NNT : tel-00353412.

Prades-Sagarra, E., Laarakker, F., Dissy, J., Lieuwes, N. G., Biemans, R., Dubail, M., ... & Bassing, C. H. (2023). Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), a natural polyphenol to increase the therapeutic window for lung adenocarcinomas. *Radiotherapy and Oncology*, 190, 110021.



Ramachandran, S., Nagarajan, R. P., Subramanian, U., Ali Masmali, A. K., Almubrad, T., & Akhtar, S. (2020). Inhibitory Effect of Ursolic Acid on Ultraviolet B Radiation-Induced Oxidative Stress and Proinflammatory Response-Mediated Senescence in Human Skin Dermal Fibroblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, Article ID 1246510.

Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., & Furdui, C. M. (2014). Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 260–292.

Rezaeyan, A., Haddadi, G.H., Hosseinzadeh, M., Moradi, M., Najafi, M. (2016). Radioprotective effects of hesperidin on oxidative damages and histopathological changes induced by X-irradiation in rats heart tissue. *Journal of Medical Physics/Association of Medical Physicists of India*, vol. 41, no. 3, Article ID 182, 2016.

Rothkamm, K., Lobrich, M. (2003). Preuve d'un manque de réparation des cassures double brin de l'ADN dans les cellules humaines exposées à de très faibles doses de rayons X. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5057–5062.

Sánchez-Marzo N, Pérez-Sánchez A, Barrajón-Catalán E, Castillo J, Herranz-López M, Micó V. (2020). Rosemary Diterpenes and Flavanone Aglycones Provide Improved Genoprotection against UV-Induced DNA Damage in a Human Skin Cell Model. *Antioxidants*, 9(3), 255

Sarin, A. C., Bakal, R. L., Jawarkar, R. D., Gandhi, R. P., Chandak, M. P., & Lewaa, I. (2022). Role of phytochemicals as potential radioprotectants. *Bulletin of the National Research Centre*, 46, 48.

Shakyawar, S. K., Mishra, N. K., Vellichiramal, N. N., Cary, L., Helikar, T., Powers, R., ... & Singh, V. K. (2023). A Review of Radiation-Induced Alterations of Multi-Omic Profiles, Radiation Injury Biomarkers, and Countermeasures. *Radiation Research*, 199, 89–111.

Stone HB. (2003). Coleman CN, Anscher MS et al. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 2003;4:529–536.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Statistiques mondiales sur le cancer 2020 : estimations GLOBOCAN de l'incidence et de la mortalité dans le monde pour 36 cancers dans 185 pays. *CA A Cancer J. Clin.* 2021, 71, 209 à 249.

Tonnessen, BH., Pounds, L. (2011) Radiation physics. *J Vasc Surg.* 2011 Jan;53(1 Suppl):6S-8S. doi: 10.1016/j.jvs.2010.05.138

Tyler, A. S., Kirkpatrick, D. R., Smith, S., Smith, T. K., Pearson, T., Kailasam, A., ... & Agrawal, D. K. (2017). Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *Journal of Translational Medicine*, 15, 232.

ul Islam, B., Suhail, M., Khan, M.K., Zughaihi, T.A., Alserihi, R.F., Zaidi, S.K., Tabrez, S. (2021). Polyphénols en tant qu'agents anticancéreux : préoccupation toxicologique pour les cellules saines. *Phytother. Res.* 2021, 35, 6063 à 6079.

Vaurijoux, A. (2016). Etude des conséquences génétiques et épigénétiques consécutives à la signalisation persistante des dommages radio-induits de l'ADN. Université Paris-Saclay. NNT:2016 SACL5 515.

Wang, K., Tepper J.E. (2021). Toxicité associée à la radiothérapie : étiologie, prise en charge et prévention. *CA A Cancer J. Clin.* 2021, 71, 437 à 454

Wickramasinghe, JS., Udagama, PV., Dissanayaka, VHW., Weerasooriya, AD., Goonasekera HWW. (2022). Plant based radioprotectors as an adjunct to radiotherapy: advantages and limitations. *Journal of Radiological Protection*, 42(2).

Zahid, K. M., Ranjan, A., Kaur, N., Sur, S., & Tandon, V. (2016). Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Medicinal Research Reviews*, 36(3), 461–493.

Zhaeintan, P., Nickfarjam, A., Shams, A., Abdollahi-Dehkordi, S., & Hamzian, N. (2022). Radioprotective Effect of *Rosmarinus officinalis* L (Rosemary) Essential Oil on Apoptosis, Necrosis and Mitotic Death of Human Peripheral Lymphocytes (PBMCs). *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 12(3), 245–256.

Zhang, T., Liu, C., Ma, S., Gao, Y., & Wang, R. (2020). Protective Effect and Mechanism of Action of Rosmarinic Acid on Radiation-Induced Parotid Gland Injury in Rats: Potential Biomarkers of Radiation Damage. *Potential Biomarkers of Radiation Damage*, 1–11.

Zhu, H., Xie, D., Yang, Y., Huang, S., Gao, X., Peng, Y., Wang, B., Wang, J., Xiao, D., Wu, D., Li, C., Li, C., Qian, CN., Deng, X. (2022). Radioprotective effect of X-ray abdominal FLASH irradiation: Adaptation to oxidative damage and inflammatory response may be benefiting factors. *Med Phys.* 2022; 49:4812–4822.

# Annexe 1

## 1. Equipements et matériels de laboratoire

- ❖ PSM de grade II.
- ❖ Matériel de culture (flacons de culture, plaques multipuits, pipet aid, pipettes en verre, tubes de différents volumes, flacons en verre autoclavables, béchers, tubes Eppendorf).
- ❖ Incubateur à CO<sub>2</sub> et à hygrométrie réglable, thermostaté à 37°C (Forma™ Series II Water Jacket CO<sub>2</sub> Incubator).
- ❖ Réfrigérateur/ Congélateur pour la conservation des solutions et des milieux de culture.
- ❖ Autoclave pour la stérilisation du matériel de culture.
- ❖ Centrifugeuse thermostatée (Centurion Scientific K3 Series).
- ❖ Balance (SCALTEC).
- ❖ Microscope à contraste de phase inversé BRESSER-MikroLabCam.
- ❖ Microscope optique (OLYMPUS CK2).
- ❖ Microscope à fluorescence Leica DFC x345FX.
- ❖ Bain marie pour le réchauffement des milieux.
- ❖ Hématimètre de Malassez.
- ❖ Système de filtration avec filtres de 0,22µm.
- ❖ Lecteur de plaque BioTeksynergy HT.
- ❖ Agitateur de plaque (BIOBLOCK SCIENTIFIC).
- ❖ Lyophilisateur BIOBLOCK SCIENTIFIC (ALPHA 1-2 LD).
- ❖ Unité de Cobalt 60 ELDORADO.

## 2. Réactifs biologiques

- ❖ Solution Trypsine/EDTA (0,25%, 0,1%).
- ❖ PBS (Phosphate Bufferd Saline : 0,1 M, pH 7,4).
- ❖ MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) – 2,5 diphenyltetrazolium bromure].
- ❖ Dimethylsulfoxyde (DMSO).
- ❖ PBS/BSA (Phosphosphate Bufferd Saline)/ (Bovine Serum Albumine) à 3%.

- ❖ PFA (Paraformaldehyde) 4%.
- ❖ Solution de lyse.
- ❖ Anticorps I<sup>aire</sup> : mouse IgG anti-phospho-histone H2AX (Ser139), clone JBW301 (Millipore Ref 05-636).
- ❖ Anticorps II<sup>aire</sup> : Alexa Fluor® 488 goat anti- mouse IgG (H+L) (Invitrogen Ref A11001).
- ❖ Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories Ref H-1200).

## 2.1. Préparation du milieu de culture

- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)**

- DMEM (Gibco™ DMEM) ..... 13.4 g
- Bicarbonate de Sodium NaHCO<sub>3</sub>..... 3.7g
- Eau stérile ..... 1000 ml

Etalonner la solution jusqu'à atteindre pH=7.4, puis ajouter :

- SVF 10%.
- Amphotéricine B/Streptomycine.
- Penicilline A/ Streptomycine.

Filtrer à l'aide d'un système de filtration 0.22 µm puis le conserver au réfrigérateur.

## 2.2. Préparation des solutions

- **La solution PBS (Phosphate Buffer Saline)**

Soluté physiologique utilisée à des fins de lavage de cellules adhérentes ou non adhérentes afin d'éliminer toute trace du milieu. La solution ne contient aucun composant d'origine animale.

La composition ionique d'un sachet de Dulbecco Buffer Salin (gibco) est la suivante :

- NaCl .....8g
- KCl..... 0.2g
- Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1.44g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0.24g

Ajouter :

- Eau distillée ..... 1000ml

Ajustement du pH à 7.4 avec du HCl et stérilisation à l'autoclave pendant 20min à 120°C.

La solution PBS peut être conservée au réfrigérateur à 4°C.

- **Préparation de la solution de MTT :**

6 mg de MTT dans 3.3 ml de PBS, filtrer la solution et conserver une semaine à 4°C à l'abri de la lumière (Zhu *et al.*,2017).

- **Solution de fixation :**

PFA 4% Paraformaldehyde

Préparation de 50ml de solution :

- PFA .....4g

- PBS.....100ml

Mettre au bain marie à 50°C avec agitation jusqu'à dissolution totale du PFA.

- Sucrose.....2g

- **Solution de lyse :**

Préparation de 10ml de solution :

- Sucrose.....1,026g

- MgCL<sub>2</sub>.....0,006g

Mélanger les deux composés dans les 10ml de PBS.

- Tris .....0,121g dans 50 ml de PBS

Prélever 0.2 ml dans 10ml de PBS.

- NaCL.....0,136g dans 50 ml de PBS

Prélever 0,1ml dans 10ml de PBS.

- Triton .....0,5ml dans 100 ml de PBS

Prélever 0,05ml dans 10ml de PBS.

- **PBS/BSA 3% :**

- BSA (Bovine Serum Albumine).....3g dans 10ml de PBS.

- **Solution d'anticorps :**

- BSA.....3 dans 10ml de PBS

- Ac I<sup>aire</sup> .....1 dans 100µl de solution BSA en raison de 30µl par lamelle

- Ac II<sup>aire</sup> ..... 5µl dans 500µl de solution de BSA en raison de 30µl par lamelle.

## Annexe 2

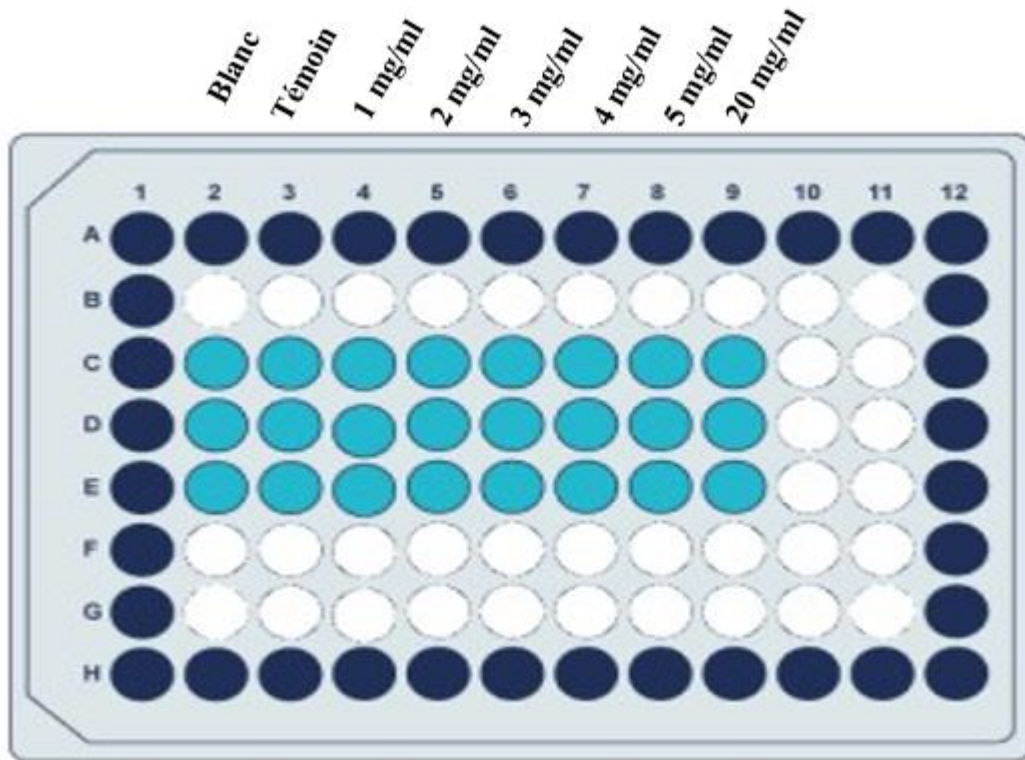


Figure 1: Schéma représentant la plaque à 96 puits utilisée

Blanc : DMSO

Témoin : Cellules Vero+ milieu DMEM

1 mg/ml : Cellules Vero+ milieu DMEM +1 mg/ml de l'EBR

2 mg/ml : Cellules Vero+ milieu DMEM +2 mg/ml de l'EBR

3 mg/ml : Cellules Vero+ milieu DMEM+ 3 mg/ml de l'EBR

4 mg/ml : Cellules Vero+ milieu DMEM + 4mg/ml de l'EBR

5 mg/ml : Cellules Vero+ milieu DMEM + 5 mg/ml de l'EBR

20 mg/ml : Cellules Vero+ milieu DMEM + 20 mg/ml de l'EBR

## Annexe 3

Les tableaux qui suivent sont les résultats des concentrations inhibitrices à 50% (IC50) :

- Avec Traitement

Temps d'incubation	IC 50
24h	13,08
48h	13,75

- Traitement post-irradiation

Temps d'incubation	IC 50
24h	9,43
48h	12,81

## Abstract

Radiotherapy is the most common treatment modality for cancer. Exposure of healthy organs or tissues to ionizing radiation during treatment can cause various adverse effects. Normal tissues must be protected from radiation damage. Therefore, the role of radioprotective compounds is crucial for the optimization of radiotherapy.

In this context, we studied the role of the crude extract of rosemary leaves *Rosmarinus officinalis*, rich in bioactive molecules, as a radioprotector on the Vero cell line. The cytotoxic activity and radioprotective potential of crude rosemary extract (EBR) on Vero cells irradiated with gamma radiation were evaluated by the MTT colorimetric test. Tests carried out on the cells with EBR revealed an absence of cytotoxicity whatever the incubation period is (24h and 48h). This confirms the safety of EBR on the Vero cell line. Furthermore, a combined treatment of EBR and gamma irradiation significantly increased cell survival, particularly at a concentration of 1 mg/ml. Analysis of radiation-induced apoptosis by flow cytometry showed a high level of apoptosis (81.1%) in untreated irradiated cells. The presence of EBR significantly reduced the percentage of apoptosis detected, the percentage of which is 6.4%. The immunofluorescence technique makes it possible to detect DNA damage, by observing  $\gamma$ -H2AX linked to double-strand breaks (DSBs). Pretreatment with EBR led to significant reductions in these (DSBs).

These results indicate that rosemary crude extract could offer a promising therapeutic prospect as a radioprotectant.

**Keywords:** Radiotherapy, *Rosmarinus officinalis*,  $\gamma$ -H2AX, Radioprotector.

## الملخص

العلاج الإشعاعي هو طريقة العلاج الأكثر شيوعاً للسرطان. إن تعرض الأعضاء أو الأنسجة السليمة للإشعاعات المؤينة أثناء العلاج يمكن أن يسبب تأثيرات ضارة مختلفة. يجب حماية الأنسجة الطبيعية من أضرار الإشعاع. ولذلك، فإن دور المركبات الواقية من الإشعاع أمر بالغ الأهمية لتحسين العلاج الإشعاعي وفي هذا السياق، قمنا بدراسة دور المستخلص الخام لأوراق إكليل الجبل الغني بالجزئيات النشطة بيولوجياً، كواقى إشعاعي على خلايا الفيرو.

تم تقييم النشاط السام للخلايا وإمكانات الحماية الإشعاعية لمستخلص إكليل الجبل الخام على الخلايا الفيرو المعرضة لأشعة جاما بواسطة اختبار القياس اللوني. كشفت الاختبارات التي أجريت على الخلايا التي تحتوي على المستخلص الخام عن عدم وجود سمية للخلايا مهما كانت فترة الحضانة (24 ساعة و48 ساعة). وهذا يؤكد سلامة المستخلص على الخلايا فيرو. علاوة على ذلك، أدى العلاج المشترك الذي يجمع بين المستخلص الخام و الأشعة جاما الى زيادة كبيرة في سلامة الخلية خاصة عند تركيز 1 مغ \م. أظهر تحليل موت الخلايا المبرمج الناجم عن الإشعاع عن طريق قياس التدفق الخلوي مستوى عالٍ من موت الخلايا المبرمج (81.1٪) في الخلايا المشععة غير المعالجة وانخفاضاً كبيراً في معدل الموت المبرمج للخلايا المعالجة بالمستخلص الخام لإكليل الجبل. تتيح تقنية التآلق المناعي اكتشاف المرتبط بالفواصل المزدوجة تلف الحمض النووي، من خلال مراقبة  $\gamma$ -H2AX

تشير هذه النتائج إلى أن مستخلص إكليل الجبل الخام يمكن أن يقدم آفاقاً علاجية واعدة باعتباره واقياً من الإشعاع

**الكلمات المفتاحية:** العلاج الإشعاعي، إكليل الجبل المخزني،  $\gamma$ -H2AX، واقى الأشعة.